

**ZUM NACHWEIS VON
STAPHYLOKOKKENENTEROTOXIN
IN LEBENSMITTELN MITTELS
FROSCHSPERMATEST UND DEM
VORGESCHALTETEN EXTRAKTIONSVERFAHREN**

Klaus Gantze

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0009

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
der Universität München
Fachbereich Tiermedizin
Vorstand: Professor Dr. G. Terplan

ZUM NACHWEIS VON STAPHYLOKOKKENENTEROTOXINEN
IN LEBENSMITTELN MITTELS FROSCHSPERMATEST
UND DEM VORGESCHALTETEN EXTRAKTIONSVERFAHREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Klaus Gantze
aus Magdeburg

München 1976



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Professor Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Professor Dr. G. Terplan
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H. G. Buschmann

Tag der Promotion: 27. Februar 1976

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1. Allgemeines zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen	2
2.2. Biologische Verfahren	2
2.2.1. Affen	3
2.2.2. Katzen	6
2.2.3. Hunde	11
2.2.4. Kaninchen	12
2.2.5. Mäuse	12
2.2.6. Ratten	13
2.2.7. Meerschweinchen	13
2.2.8. Isolierte Darmsegmente	14
2.2.9. Schweine (Ferkel)	16
2.2.10. Hühnerembryonen	16
2.2.11. Fische	17
2.2.12. Frösche	18
2.2.13. Spermien von Wirbeltieren	20
2.2.14. Krebse	23
2.2.15. Insekten	23
2.2.16. Nematoden	24
2.2.17. Protozoen	25
2.2.18. Mikroorganismen	26
2.2.19. Zellkulturen	27
2.2.20. Gewebe	30
2.3. Immunologische Verfahren	30
2.4. Nachweis von Enterotoxinen in Lebensmitteln	31
3. Eigene Untersuchungen	34
3.1. Material und Methodik	34
3.1.1. Froschspermatest (FST)	34
3.1.1.1. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Enterotoxin A bzw. B	35

3.1.1.2. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Enterotoxinlösungsmitteln und Extraktionsmitteln	36
3.1.1.3. Verhalten der Froschspermien gegenüber nichtenterotoxinartigen bakteriellen Stoffwechselprodukten ...	37
3.1.2. Isolierung und Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin	38
3.1.2.1. Erhitzen	40
3.1.2.2. Dialyse und Konzentration	41
3.1.2.3. Gelfiltration	42
3.1.2.4. Wiedergewinnungsrate	44
3.2. Ergebnisse	46
3.2.1. Froschspermatest (FST)	46
3.2.1.1. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Enterotoxin A bzw. B	46
3.2.1.2. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Enterotoxinlösungsmitteln und Extraktionsmitteln ..	50
3.2.1.3. Verhalten der Froschspermien gegenüber sonstigen bakteriellen Stoffwechselprodukten	52
3.2.2. Isolierung und Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin	52
3.2.2.1. Erhitzen	52
3.2.2.2. Dialyse und Konzentration	56
3.2.2.3. Gelfiltration	56
3.2.2.4. Wiedergewinnungsrate	59
4. Besprechung der Ergebnisse	64
5. Zusammenfassung/Summary	72
6. Literatur	75

1. Einleitung

Die Zunahme des Anteils der Staphylokokken-Enterotoxikosen an Lebensmittelintoxikationen erfordert praktikable und zuverlässige Toxinnachweisverfahren, welche die bisher nur von wenigen Instituten beherrschten Methoden ersetzen können. Die erwünschten Verfahren sollten neben der Aufklärung von Intoxikationen auch der prophylaktischen Untersuchung risikobehafteter Lebensmittel dienen. Sie müssen in der Lage sein, Enterotoxine qualitativ und quantitativ (die minimale toxische Dosis für den Menschen) zu erfassen. Diesen Ansprüchen scheint das Verfahren nach STOJANOW und SCHENK (1966) zu entsprechen, bei dem nach einem einfachen Extraktionsverfahren und rascher serologischer Identifizierung die Toxinmenge mit Hilfe der Abnahme der Froschpermienbewegungsaktivität ermittelt wird. Da einerseits an dem in wissenschaftlichen Publikationen nur unvollständig, in Patenten etwas näher definierten Verfahren, Zweifel aufgekommen waren, andererseits die Methode die erwähnten Vorteile aufweisen soll, wurde mir die Aufgabe gestellt, das Verfahren auf Praktikabilität und Zuverlässigkeit zu prüfen.

2. Schrifttum

2.1. Allgemeines zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen

Ein Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln mittels chemischer Verfahren scheint nicht möglich, da Enterotoxine Proteine sind und es im allgemeinen keine für einzelne Proteine spezifische Verfahren gibt (BERGDOLL, 1970). Der Nachweis mittels chemisch-physiologischer Verfahren, z.B. Disk-Elektrophorese, muß auf weitgehend gereinigte und relativ hohe Konzentrationen aufweisende Extrakte beschränkt bleiben. Als geeignete Methoden haben sich bisher solche erwiesen, in denen entweder die biologische Aktivität der Enterotoxine, d.h. deren Wirkung auf Lebewesen oder Zellen, oder die immunogene Eigenschaft des Enterotoxinmoleküls genutzt werden.

2.2. Biologische Verfahren

Bevor immunologische Verfahren zum spezifischen Enterotoxinnachweis zur Verfügung standen, konnte dieser nur mit biologischen Methoden und dementsprechend unzuverlässig geführt werden. Für diesen Zweck wäre zweifellos der Mensch am besten geeignet; abgesehen von wenigen Freiwilligenversuchen scheidet diese Möglichkeit selbstverständlich aus. Es wurde daher schon frühzeitig nach Versuchstieren gesucht, die eine ausreichende und spezifische Empfindlichkeit dem Enterotoxin gegenüber aufwiesen. Allerdings erwiesen sich die meisten biologischen Tests als nicht geeignet, da sie entweder zu wenig sensitiv oder zu wenig spezifisch waren. Zwei Versuchstiere wurden, wie bereits DAVISON und DACK (1939) berichteten, als geeignet befunden, der Affe und das Kätzchen, wobei die Applikation oral (Affe) bzw. intraperitoneal (Katze) erfolgt. Beide Verfahren, die als die klassischen biologischen Tests gelten, weisen einige Nachteile auf. Bei den Affen sind insbesondere Beschaffung und Haltung sehr aufwendig, während Kätzchen nur während der Wurfzeit im Frühjahr und Herbst in ausreichender Menge zur Verfügung stehen (OBIGER, 1961). Beide Tests sind weniger empfindlich als

der Freiwilligenversuch. Außerdem können natürliche Resistenz bzw. erworbene Immunität falschnegative Resultate bedingen. Der Affenfütterungstest bietet gegenüber dem Katzentest den Vorteil, daß die emetische Reaktion spezifisch für Enterotoxin ist und eine Vorbehandlung der Proben zur Ausschaltung anderer Stoffwechselprodukte im Gegensatz zur parenteralen Applikation nicht erforderlich ist (DAVISON und DACK, 1939; SURGALLA und HITE, 1945; THATCHER und ROBINSON, 1962; u.a.). Nach OBIGER (1961) ist sogar in Frage zu stellen, ob der positive Kätzchentest ein sicherer Beweis für das Vorhandensein von Enterotoxin ist, da dieses im Katzendarm völlig wirkungslos bleibt und erst nach intraperitonealer Verabreichung die typischen Krankheitserscheinungen auslöst. Schließlich bleibt zu erwähnen, daß Kätzchen Enterotoxin C gegenüber besonders wenig empfindlich sind (CASMAN et al., 1967; BERGDOLL, 1970). Wenn dennoch der Kätzchentest, insbesondere in Europa, häufiger zum Enterotoxinnachweis herangezogen wird als der Affenfütterungstest, so ist dies in erster Linie darauf zurückzuführen, daß bei den jeweils gegebenen finanziellen und räumlichen Möglichkeiten nicht mit Affen gearbeitet werden kann (KIENITZ, 1958 c).

Im folgenden wird auf verschiedene biologische Verfahren detaillierter eingegangen. Dabei wurden jedoch aus einer Vielzahl von Publikationen über die Eignung von Affen bzw. Katzen zum Enterotoxinnachweis nur die wichtigsten berücksichtigt und Ergebnisse von experimentellen Versuchen zur Pathophysiologie der Enterotoxämie nur in Ausnahmefällen miteinbezogen.

2.2.1. Affen

Bereits BARBER (1914), der als erster von einer durch Staphylokokken bedingten Intoxikation nach Genuß von roher Milch berichtet hat, setzte Affen zum Nachweis des toxischen Prinzips ein. Er konnte bei oralen Verabreichung des enterotoxinhaltigen Kulturfiltrates keine krankmachenden Wirkungen beobachten. Gleiches berichteten auch DACK et al.

(1930), deren Untersuchungen ebenso wie jene von JORDAN (1930) als Beginn der modernen Ära in der Enterotoxinforschung angesehen werden. JORDAN und McBROOM (1931) registrierten dann zwar bei 6 kg schweren Rhesus-Affen, denen bis zu 70 ml eines im Freiwilligenversuch toxischen Kulturfiltrates per os eingegeben worden war, ebenfalls noch keine positiven Resultate, wohl aber bei jungen, ca. 2 kg schweren Affen anderer Arten, und zwar *Ateles geoffroyi*, *Ateles ater*, *Alouota palliata inconsonans* bzw. *Cebus capucinus capucinus*, die gleichen Symptome wie bei Freiwilligen. JORDAN und BURROWS (1933) sowie WOOLPERT und DACK (1933) bestätigten die gute Eignung des Affenfütterungstests und empfahlen, nur das Erbrechen als positive Reaktion zu bewerten. Dabei vertraten letztgenannte Autoren außerdem die Ansicht, daß junge Affen "aufgrund geringerer natürlicher Resistenz" vermutlich besser geeignet seien als erwachsene Tiere, diese jedoch im allgemeinen ebenfalls brauchbar seien. Als Nachteil dieses Verfahrens wurde genannt, daß der Affenfütterungstest bei geringen Enterotoxinkonzentrationen versagt, bei denen Freiwillige noch die typischen Intoxikationserscheinungen zeigen. Außerdem wurde in der Folge wiederholt auf die z.T. deutlichen Unterschiede in der Reaktionslage der Rhesusaffen - bedingt durch primäre Resistenz bzw. erworbene Immunität - hingewiesen (SHAUGHNESSY und GRUBB, 1936; KUPCHICK, 1937; MINETT, 1938; DAVISON und DACK, 1939; SURGALLA und HITE, 1945; u.a.).

Am Food Research Institute in Chicago wurden die Affenfütterungstests daher seit Anfang der 50iger Jahre - soweit möglich - mit sechs jungen 2 - 3 kg schweren Rhesus-Affen pro Versuch (jeweils 50 ml Material) durchgeführt (BERGDOLL et al., 1951; SURGALLA, BERGDOLL und DACK, 1953). Da die Affen aufgrund der hohen Kosten wiederholt zum Enterotoxinnachweis eingesetzt werden mußten, wurde jeweils eine Gruppe aus drei "empfindlichen" und drei "resistenten" Tieren gebildet (als "resistent" wurden Affen bezeichnet, die bei vorhergehenden Versuchen im Gegensatz zu anderen mit der gleichen Toxinmenge gefütterten Tieren nicht erbrochen hatten, als "empfindlich" alle anderen Affen, auch vorher noch nicht zum Enterotoxinnachweis eingesetzte Tiere). Nach Ansicht von

SURGALLA, BERGDOLL und DACK (1953) weist das Erbrechen bei mindestens zwei der sechs im Versuch stehenden Affen innerhalb von 5 Stunden nach oraler Applikation darauf hin, daß das verabreichte Material Enterotoxin enthielt. Obgleich dieses Verfahren nur ein qualitatives ist, kann es nach BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK (1961) auch zur Bestimmung der ungefähren Enterotoxinkonzentration herangezogen werden. Diese Autoren gehen davon aus, daß in dem verfütterten Material mindestens eine emetische Dosis vorhanden ist, wenn zwei bis vier der sechs Affen erbrechen. In einer anderen Publikation (SUGIYAMA, BERGDOLL und DACK, 1962) wird darauf hingewiesen, daß aus der Häufigkeit des Erbrechens und der Frist zwischen Fütterung und erstmaligem Erbrechen ebenfalls Rückschlüsse auf den Enterotoxingehalt der Probe gezogen werden können. Bei gereinigten Enterotoxinen (Typen A, B, C₁, C₂ bzw. E) liegt die emetische Dosis (ED₅₀) bei Rhesus-Affen bei 5 - 10 mcg/kg Körpergewicht (BERGDOLL et al., 1973); Schimpansen sollen um das Zehnfache empfindlicher reagieren (WILSON, 1959).

Bei den Affenfütterungstests ist - wie bereits angedeutet wurde - zu berücksichtigen, daß eine wiederholte Verabfolgung des gleichen Materials zu einer "permanenten Immunität" führt (SUGIYAMA, BERGDOLL und DACK, 1962). Nach Angabe dieser Autoren bildet sich innerhalb von 24 Std. nach Applikation eine deutliche Resistenz gegenüber dem entsprechenden Enterotoxintyp aus, die nur dann nach einigen Wochen wieder verschwindet, wenn die Affen in dieser Zeit nicht zum Enterotoxinnachweis eingesetzt werden. Im Food Research Institute werden Affen daher mindestens eine Woche nach dem letzten Versuch nicht verwendet und beim nächsten Test mit der doppelten Dosis gefüttert, sofern es sich um den gleichen Enterotoxintyp handelt. Falschpositive Ergebnisse nach Verfütterung unbeimpfter Medien, nichtenterotoxinhaltiger Filtrate etc. wurden nicht beobachtet (SURGALLA, BERGDOLL und DACK, 1953).

Aufgrund der im Vergleich zum Freiwilligen-Versuch deutlich geringeren Empfindlichkeit des Affenfütterungstests wurde bereits von JORDAN und

BURROWS (1933) sowie WOOLPERT und DACK (1933) die intravenöse Applikation zur Diskussion gestellt. Bei dieser Applikationsart reagierten die Affen erheblich empfindlicher als bei oraler Verabreichung, z.T. starben die Versuchstiere auch. Allerdings wurden keine Maßnahmen zur Ausschaltung nichtenterotoxinspezifischer Reaktionen getroffen, so daß der Wert dieser Beobachtungen nur bedingt ist. DAVISON, DACK und CARY (1938) schlugen dann zur Vermeidung falschpositiver Resultate vor, die Filtrate vor Injektion mit neutralisierenden Antikörpern gegenüber anderen Toxinen (Hämolysin, letales Toxin etc.) zu versetzen, anstatt sie zu erhitzen oder mit Formalin zu behandeln (DOLMAN, WILSON und COCKROFT, 1936). Die positive Reaktion gleicht im wesentlichen der des Fütterungstests (KIENITZ, 1958 c), auch wenn bei intravenöser Applikation der Durchfall zumeist im Vordergrund steht und die Symptome etwas später abklingen (McGANN, ROLLINS und MASON, 1971). Allerdings sind wiederholt auch Fieber und schockartige Symptome, z.T. verbunden mit dem Tod der Versuchstiere, beschrieben worden (HAYAMA und SUGIYAMA, 1964; CRAWLEY et al., 1966; RAPOPORT et al., 1966; HODOVAL et al., 1968; BEISEL, 1972), zumeist jedoch erst bei höherer Dosierung. Die emetische Dosis (ED_{50}) für Rhesus-Affen liegt bei intravenöser Applikation von Enterotoxin A bei 0,03 mcg/kg Körpergewicht (SCHANTZ et al., 1972), von Enterotoxin B bei 0,1 mcg/kg Körpergewicht (SCHANTZ et al., 1965), von Enterotoxin C₁ und C₂ bei 0,5 mcg/Tier (BERGDOLL, BORJA und AVENA, 1965; BORJA und BERGDOLL, 1967; AVENA und BERGDOLL, 1967) und von Enterotoxin E ebenfalls bei 0,5 mcg/Tier (BERGDOLL et al., 1971; BORJA et al., 1972). Diese Werte beziehen sich jeweils auf gereinigte Enterotoxine.

2.2.2. Katzen

BARBER (1914) war vermutlich auch der erste, der Enterotoxin durch Fütterungsversuche an Kätzchen nachzuweisen suchte. Dies gelang BARBER sowie später MEYER (1951) und OBIGER (1960; 1961) jedoch im Gegensatz zu RAMSEY und TRACY (1931), TANNER und RAMSEY (1932), WORSECK (1956) sowie PROHASKA et al. (1959) in keinem Falle. Positive Reaktionen

äußerten sich, nach vorangehender Unruhe, Schütteln des Kopfes und Schreien, in Erbrechen; vereinzelt war auch Durchfall zu beobachten. Unterschiedliche Reaktionen in Abhängigkeit vom Versuchsalter der Tiere beschrieben MINETT (1938) sowie PROHASKA et al. (1959). Während ersterer nur bei sechs von 22 erwachsenen Katzen, nicht aber bei Kätzchen Erbrechen registrierte, waren nach PROHASKA et al. die typischen Symptome bei Kätzchen stärker ausgeprägt als bei Katzen. MATHESON und THATCHER (1955) konnten zwar bei 17 von 23 Katzen Unruhe und Durchfall auslösen, beobachteten jedoch kein Erbrechen, obwohl die verfütterte Dosis das 150fache der bei intraperitonealer Injektion positiven Minimaldosis betrug. Inwieweit die Vermutung von KIENITZ (1958 c) zutrifft, daß die negativen Resultate auf zu niedrige Dosierung zurückzuführen sind, läßt sich auch bei Berücksichtigung der Daten (Übersicht 1) von BAYLISS (1940) nicht mit Sicherheit angeben.

Übersicht 1: Einfluß der Applikationsart auf die Reaktion (Erbrechen) von Katzen nach Gabe von "enterotoxinhaltigem" Kulturfiltrat

Applikationsart	Menge (ml)/kg	Anzahl der Tiere	Ergebnis
oral	30	8	negativ
subkutan	8	6	negativ
intramuskulär	8	6	negativ
intravenös	1 - 2	8	positiv
intracardial	1	8	positiv
intraperitoneal	1	> 100	positiv

Die intraperitoneale Applikation, der in der Folge unter den "Katzen-tests" die größte Bedeutung zukam, wurde von DOLMAN, WILSON und COCKROFT (1936) eingeführt. Sie bedienten sich 6 - 8 Wochen alter Kätzchen, die 350 - 550 g wogen. Einige Autoren (MINETT, 1938; RIGDON, 1938; BAYLISS, 1940; MATHESON und THATCHER, 1955; u.a.) berichteten auch über

gute Ergebnisse bei bis zu 4500 g schweren Tieren. Die zu injizierende Dosis beträgt 2 - 4 ml/kg Körpergewicht, bei Jungtieren also insgesamt 1 - 3 ml (KIENITZ, 1958 c). Nach MATHESON und THATCHER (1955) sollte das Gesamtvolumen selbst bei hochkonzentrierten Enterotoxinpräparationen mindestens 0,5 ml messen und eventuell mit Wasser auf diese Menge gebracht werden, da bei kleineren Volumina häufig nur bei etwa 50% der Tiere positive Reaktionen ausgelöst wurden. Da bei parenteraler Applikation im Gegensatz zur oralen Verabfolgung Erbrechen nicht nur durch Enterotoxine, sondern auch durch andere Staphylokokkenstoffwechselprodukte hervorgerufen werden kann, müssen diese Substanzen vor Versuchsbeginn möglichst ausgeschaltet werden. DOLMAN, WILSON und COCKROFT (1936) empfahlen für diesen Zweck eine Erhitzung der Kulturfiltrate für 30 Min. auf 100°C bzw. eine mehrtägige Inkubation mit 0,3%iger Formalinlösung. Da beide Methoden mit gewissen Nachteilen behaftet sind - Aktivitätsverlust beim Erhitzen bzw. lange Inkubationszeit beim Formalinzusatz - , schlugen DAVISON, DACK und CARY (1938) sowie DOLMAN und WILSON (1938) später vor, den Kulturfiltraten Antiseren gegen die störenden Substanzen (z.B. Hämolsine) zuzusetzen und diese so zu neutralisieren. THATCHER und MATHESON (1955) bevorzugten eine kombinierte Behandlung (Erhitzung auf 100°C und anschließend Zusatz von Ascorbinsäure), da auf diese Weise die während des Kochens nicht inaktivierten β -Hämolsinmengen weiter reduziert werden konnten. DENNY und BOHRER (1963) empfehlen schließlich eine Kombination von Trypsinverdauung, Ultrafiltration und Erhitzung auf 100°C, um positive Reaktionen durch Kulturfiltrate gramnegativer Keime mit Sicherheit ausschließen zu können, während CASMAN und BENNETT (1963) eine Behandlung mit 0,2% Pankreatin für ausreichend erachten. Das geprüfte Filtrat wird als enterotoxinhaltig angesehen, wenn etwa 20 - 60 Minuten nach der Injektion, häufig auch später (MATHESON und THATCHER, 1955), die Katzen unruhig werden, zittern, schreien, den Kopf schütteln und nach vorangehendem Speicheln zu erbrechen beginnen. Das Erbrechen wiederholt sich, dann verfallen die Tiere für einige Zeit in Apathie und sind im allgemeinen nach wenigen Stunden, spätestens aber nach einem Tag wieder wohlauf (MATHESON und THATCHER, 1955).

Nicht immer halten die Ergebnisse der verschiedenen Autoren einer kritischen Beurteilung stand, zumal dann nicht, wenn die Versuchsanordnung verändert oder nur unvollständig eingehalten wurde und die Stämme nach längerer Aufbewahrung vor dem Test keine erneute Aktivierung erfuhren (KIENITZ, 1958 c). Von größerer Bedeutung ist das Problem der unspezifischen Reaktionen. Während z.B. DOLMAN, WILSON und COCKROFT (1936), GWATKIN (1937), DOLMAN und WILSON (1938), SURGALLA (1947), MOSER (1953), MATHESON und THATCHER (1955) sowie DENNY und BOHRER (1963) bei Applikation unbeimpfter Nährmedien kein Erbrechen beobachteten, registrierten RIGDON (1938), JONES und LOCHHEAD (1939), SINGER und HAGAN (1941), HUSSEMAN und TANNER (1949) sowie WORSECK (1956) derartige falschpositive Reaktionen, und zwar bei etwa 20 - 25% der getesteten Kätzchen. Die Ursache dieser unspezifischen Reaktionen ist wahrscheinlich ein Peritonealreiz als Folge der Injektion (HAMMON, 1941; DACK, 1952), obwohl auch Nebenwirkungen seitens des Mediums nach DACK (1952) nicht ausgeschlossen werden können. Zur Ausschaltung derartiger Reaktionen sollten Kontrollen mit unbeimpften Nährmedien wie auch Filtraten nichtenterotoxinbildender Staphylokokken stets mitlaufen (RIGDON, 1938; DACK, 1952). Nach Ansicht von WORSECK (1956) sollten für jeden Versuch drei Tiere zur Verfügung stehen, zwei für das zu testende Material und eines für steriles Nährmedium; MOSER (1953) verwendete sogar zwei Kontrolltiere. Ein weiteres Problem ist die Frage, ob nicht die in ungereinigten Filtraten auch nach Vorbehandlung noch in geringen Mengen anzutreffenden anderen Staphylokokkenstoffwechselprodukte für die Brechwirkung verantwortlich zu machen sind. WOODWARD und SLANETZ (1941), SLANETZ (1942), FULTON (1943), NORTH (1943), SURGALLA und HITE (1945), SURGALLA (1947) sowie THATCHER und MATHESON (1955) bejahten diese Möglichkeit im Hinblick auf das β -Hämolysin. Dabei war bemerkenswert, daß das durch β -Hämolysin hervorgerufene Erbrechen weder dem Zeitpunkt des Beginns noch dem Typ nach von dem durch Staphylokokken-Enterotoxin bewirkten Erbrechen unterschieden werden konnte (SURGALLA und HITE, 1945; THATCHER und MATHESON, 1955). Allerdings sind die in erhitzten Kulturfiltraten vorhandenen Mengen an β -Hämolysin zumeist zu gering, um einen derartigen Effekt aus-

zulösen. Nach THATCHER und MATHESON (1955) waren dafür z.B. 80 Einheiten/kg Körpergewicht erforderlich, die von diesen Autoren in erhitzten Kulturfiltraten jedoch nie beobachtet wurden. Schließlich ist zur Vermeidung falschpositiver Ergebnisse unbedingt dafür zu sorgen, daß stets nur gesunde Tiere zum Einsatz kommen. Sonst besteht die Gefahr, daß bei Erkrankungen, die mit Erbrechen und Durchfall verbunden sind – wie Panleukopenie –, diese Symptome u.U. fälschlicherweise als positiver Ausfall des Tests angesehen werden (HAMMON, 1941; SURGALLA, 1947). Bei der Durchführung des Katzentests sind auch falschnegative Resultate u.U. nicht auszuschließen. Diese sind seltener auf "primäre Resistenz" gegenüber dem Enterotoxin zurückzuführen (SURGALLA, 1947; MATHESON und THATCHER, 1955), häufiger auf eine nach wiederholter Applikation erworbene Immunität (DOLMAN und WILSON, 1938; HAMMON, 1941; SURGALLA, 1947; MATHESON und THATCHER, 1955; THATCHER und ROBINSON, 1962; HÖHNE, 1967). HAMMON (1941) empfiehlt zum Ausschluß derartiger falschnegativer Reaktionen daher, Katzen nicht häufiger als viermal einzusetzen und ein negatives Ergebnis erst dann zu akzeptieren, wenn auch bei zwei, zuvor noch nicht zum Enterotoxinnachweis verwendeten, Katzen kein Erbrechen provoziert wird.

Die ersten Untersuchungen zur Eignung der intravenösen Injektion zum Enterotoxinnachweis sind widersprüchlich. JORDAN und BURROWS (1933) konnten bei im Affenfütterungstest positiven Proben kein Erbrechen beobachten, während WOOLPERT und DACK (1933) diese Symptome zwar bei Katzen beobachteten, nicht aber bei Freiwilligen und Affen. DAVISON, DACK und CARY (1938) berichteten dann, daß bei intravenöser Injektion von Kulturfiltraten zufriedenstellende Ergebnisse nur zu erzielen seien, sofern die Filtrate zur Eliminierung anderer Stoffwechselprodukte vorbehandelt worden seien. Die Reaktionsweise der Tiere entspricht der bei intraperitonealer Injektion, die Reaktionszeit ist im allgemeinen jedoch etwas kürzer (im Durchschnitt 30 Min.). HAMMON (1941), der diesen Test im Detail beschreibt, zieht die intravenöse Applikation der intraperitonealen vor (keine falschpositiven Resultate, geringer Ausbildung von Immunität nach wiederholter Applikation). Hinsichtlich der Sensitivität scheinen keine merklichen Unterschiede vorzuliegen (Übersicht 1).

Auf die Versuche an isolierten Darmsegmenten von Katzen (BAYLISS, 1940) wird an anderer Stelle (2.2.8.) eingegangen.

2.2.3. Hunde

BARBER (1914) testete auch Welpen auf ihre Eignung zum Enterotoxin-nachweis, indem er ihnen enterotoxinhaltige Kulturfiltrate per os verabfolgte. Reaktionen wurden von ihm jedoch ebensowenig festgestellt wie von MINETT (1938), der für diesen Zweck 6 - 12 Monate alte Hunde verwendete. Im Gegensatz dazu halten NIKODEMUSZ, KANIZSAI und SELLEI (1963) die Fütterung von erwachsenen Hunden (14 - 18 kg) für ein geeignetes Verfahren. Sie registrieren nach ca. 4 - 5 Std. wiederholt Diarrhoe (der Kot war häufig mit Blut und Schleim durchsetzt) und andere klinische Symptome, aber nur selten Erbrechen. Die Unterschiede zu MINETT (1938) führten die Autoren darauf zurück, daß sie höhere Dosen einsetzten, da Hunde weniger empfindlich reagieren als der Mensch bzw. die Katze.

Auch bei intravenöser Injektion enterotoxinhaltiger Kulturfiltrate wurden widersprüchliche Resultate erzielt. So konnten JORDAN und BURROWS (1933) keine Effekte beobachten, während GILBERT (1966) bei Beagles Erbrechen und Diarrhoe registrierte. Bei intraperitonealer Applikation an Collie-Welpen (DOLMAN und WILSON, 1938) sowie bei Verbringen des zu testenden Materials in den Dünndarm über eine künstlich angelegte Darmfistel (WARREN et al., 1964) wurden positive Resultate verzeichnet. Allerdings beobachtete RIGDON (1938) auch Erbrechen, wenn Welpen unbeimpfte Kulturmedien intraperitoneal verabfolgt wurden.

Nach KIENITZ (1958 c) ist die Beschaffung und Haltung von Hunden schwieriger und kostspieliger als die von Katzen. Da Hunde zudem offenbar nur wenig empfindlich gegen Staphylokokkenenterotoxine sind, scheiden Experimente am Hund nach Ansicht dieses Autors aus der Reihe der diskutablen Nachweisverfahren aus.

2.2.4. Kaninchen

Die ersten Mitteilungen über die Verwendung von Kaninchen zum Enterotoxinnachweis stammen vermutlich von DACK et al. (1930). Diese Autoren registrierten zwar nach Verfütterung der Kulturfiltrate keine positiven Reaktionen, wohl aber nach intravenöser Applikation (Diarrhoe, Tod). BORTHWICK (1933) wies in diesem Zusammenhang darauf hin, daß bei der oralen Verabreichung der H-Ionenkonzentration des Magensaftes eine entscheidende Bedeutung zukommt und nur bei vorheriger Einstellung des Magensaftes auf pH 7,3 positive Resultate zu erwarten seien. PROHASKA et al. (1959) beschrieben diese (Diarrhoe, Tod) jedoch bei Chinchilla-Kaninchen, auch ohne zuvor den pH des Magensaftes zu korrigieren.

Während KUPCHIK (1937) bei intravenöser - und auch intraperitonealer - Verabfolgung von Kulturfiltraten ebenfalls positive Resultate erzielte, gelang dies JORDAN und BURROWS (1933) sowie DOLMAN und WILSON (1938) nicht. Letztgenannte Autoren berichteten außerdem, daß auch die intraperitoneale Injektion von Filtraten ohne jeden Effekt blieb. KIENITZ (1958 c) vertritt daher die Ansicht, daß Kaninchen für den Enterotoxinnachweis nicht geeignet seien.

Auf die Versuche an isolierten Darmsegmenten von Kaninchen (MINARD, 1939; RICHMOND, 1939; BAYLISS, 1940; RICHMOND et al., 1942; ANDERSON, 1953; ANDERSON, JAMES und MARKS, 1954; KELSEY und HOBBS, 1954; SEDLAK, 1957; SEDLAK und PRUCHOVA, 1958) wird an anderer Stelle (2.2.8.) eingegangen.

2.2.5. Mäuse

Die ersten Angaben zum Einsatz von Mäusen zum Enterotoxinnachweis stammen von DACK et al. (1930). Diese Autoren konnten ebenso wie URBACH (1950) bei oralen Applikation enterotoxinhaltigen Materials keine Wirkung beobachten, während PIKKARAINEN (1938/1939) sowie LEGLER, BURKHARDT und WENDRICH (1957) eine solche (Würgebewegungen, Zittern,

gesträubtes Fell, Lidschwellungen, Tod) beschrieben. Bei intraperitonealer Verabreichung registrierten KUPCHIK (1937) und URBACH (1950) - wie auch DAVISON und DACK (1939) bei intravenöser Injektion - nur negative Ergebnisse, doch gelang es andererseits DOLMAN und WILSON (1938), MEYER (1949, 1951) sowie LEGLER, BURKHARDT und WENDRICH (1957), positive Resultate zu erzielen - ersteren jedoch nur mit einer mindestens zweifachen minimalen Katzendosis. Die intracerebrale Injektion erbrachte ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse: NIKODEMUSZ, KANIZSAI und SELLEI (1963) berichteten von Effekten (Tod innerhalb von 1 - 3 Tagen), während diese von URBACH, OEHRING und BRUNNEMANN (1968) verneint wurden.

Im Rahmen systematischer Untersuchungen kamen KIENITZ (1958 c) und OBIGER (1960, 1961) wie zuvor schon DAVISON und DACK (1939) zu dem Ergebnis, daß die Maus als Versuchstier für den Enterotoxinnachweis nicht geeignet ist, und zwar weder für die Fütterung noch für die parenterale Applikation. Die von einigen Autoren erzielten positiven Resultate wurden von KIENITZ (1958 a) auf die Anwesenheit von Hämolysin, letalem Toxin und anderen Staphylokokken-Stoffwechselprodukten in dem Kulturfiltrat zurückgeführt.

2.2.6. Ratten

Weißer Ratten eignen sich offenbar nicht zum Enterotoxinnachweis. Eine intravenöse Injektion von 0,5 bzw. 1,4 mg/Tier blieb nämlich innerhalb einer Beobachtungszeit von zwei Wochen ohne erkennbare klinische Folgen (KIENITZ et al., 1961).

Auf die Versuche an isolierten Darmsegmenten von Ratten (SEDLAK, 1957; SEDLAK und PRUCHOVA, 1958) wird an anderer Stelle (2.2.8.) eingegangen.

2.2.7. Meerschweinchen

JORDAN und BURROWS (1933), KUPCHIK (1937), DOLMAN und WILSON (1938), KIENITZ (1958 c) sowie OBIGER (1960) erzielten bei parenteraler (intravenöser bzw. intraperitonealer) Applikation enterotoxinhaltiger Filtrate

keine positiven Ergebnisse. Da gleiches auch für die orale Verabfolgung zutraf (OBIGER, 1960), vertrat OBIGER (1961) die Ansicht, daß Meerschweinchen weitgehend unempfindlich gegenüber toxischen Staphylokokken-Stoffwechselprodukten sind.

Nach BORTHWICK (1933) sind jedoch Meerschweinchen gut zum Enterotoxin-nachweis geeignet - allerdings nur unter bestimmten Voraussetzungen. Diese Schlußfolgerung zog BORTHWICK aus der Beobachtung, daß einerseits nur bei zwei von neun Meerschweinchen, die jeweils 8 - 10 ml eines Kulturfiltrates mit einer Sonde direkt in den Magen appliziert bekamen, die Symptome einer Vergiftung (Tod) provoziert wurden, andererseits aber alle Versuchstiere starben, wenn der Magensaft zuvor mit Hilfe von NaHCO_3 oder HCl auf pH 7,3 eingestellt worden war (Kontrollmeerschweinchen, bei denen der pH des Magensaftes vor Toxinverabreichung auf pH 7,8 bzw. 6,8 eingestellt worden war, zeigten wiederum keine Reaktionen). Entsprechende Verhältnisse wurden registriert, wenn das Kulturfiltrat rektal verabreicht wurde, doch wird diese Applikationsart als weniger effektiv beurteilt. Untersuchungen, die die Richtigkeit der Überlegung von BORTHWICK überzeugend widerlegen, sind nach KIENITZ (1958 c) nicht bekannt.

Auf die Versuche an isolierten Darmsegmenten vom Meerschweinchen (SEDLAK, 1957; SEDLAK und PRUCHOVA, 1958) wird an anderer Stelle (2.2.8.) eingegangen.

2.2.8. Isolierte Darmsegmente

MINARD (1939), BAYLISS (1940) sowie RICHMOND und Mitarbeiter (1939, 1942) waren vermutlich die ersten, die die Wirkung enterotoxinhaltiger Staphylokokkenfiltrate auf isolierte Darmsegmente prüften. BAYLISS verbrachte zu diesem Zweck isolierte Segmente von Katzen und Kaninchen in Ringerlösung, die 0,1 - 1% erhitzten Kulturfiltrates enthielt. Die mittels Kymographen registrierte Motilität unterschied sich jedoch nicht

von der einer mitgeführten Kontrolle, so daß der Autor zu dem Schluß kam, daß das Enterotoxin offensichtlich keine direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur des Darms ausübt. Gleiches hatte auch MINARD (1939) berichtet. RICHMOND legte etwa 4 cm lange Jejunumsegmente von Kaninchen in 60 ml Ringerlösung und tauschte anschließend 10 ml gegen die gleiche Menge Staphylokokkenkulturfiltrat aus. Als positive Reaktion wurde Zunahme des Tonus und der Motilität beurteilt. Die Rate der positiv reagierenden Darmsegmente betrug bei Verwendung "enterotoxinhaltiger" Filtrate im Mittel 77,8%, bei Kontrollen nur 17,5%. Auch ANDERSON (1953), der u.a. auch einen Einfluß der Filtratmenge auf die Aktivität bei Dünndarmsegmenten von Kaninchen beobachtete und hiermit die unterschiedlichen Ergebnisse von BAYLISS (1940) und RICHMOND et al. (1942) zu erklären versuchte, kam ebenfalls zu positiven Ergebnissen. Diese Reaktionen wurden als spezifisch angesehen, da sie durch Zusatz von α -Hämolysin-Antitoxin nicht aufgehoben wurden. Später (ANDERSON, JAMES und MARKS, 1954) stellte sich jedoch heraus, daß die Tonussteigerung offenbar nicht durch Enterotoxin, sondern durch α -Hämolysin oder einen unspezifischen Faktor bedingt war, dies aber aufgrund der Versuchsanstellung nicht erkannt wurde. Diese Feststellung wurde anschließend von KELSEY und HOBBS (1954) bestätigt.

Trotz dieser negativen Ergebnisse am Kaninchen- bzw. Katzendarm wurden von SEDLAK (1957) sowie SEDLAK und PRUCHOVA (1958) noch Versuche am Zwölffinger- bzw. Dünndarm von Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen durchgeführt. Während SEDLAK (1957) diesen Test als nicht vollkommen verläßlich im Vergleich zum Freiwilligenversuch bezeichnete, vertrat er später (SEDLAK und PRUCHOVA, 1958) die Ansicht, daß die biologische Titration des Enterotoxins am Zwölffingerdarm von Ratten (die entsprechenden Präparate von Kaninchen bzw. Meerschweinchen reagierten weniger empfindlich und spezifisch) eine für den objektiven Nachweis geeignete und genügend spezifische Methode darstelle. Die Autoren halten den Enterotoxinnachweis an isolierten Darmsegmenten jedoch aufgrund der anspruchsvollen und zeitraubenden Technik eher für experimentelle als routinemäßige Untersuchungen geeignet.

2.2.9. Schweine (Ferkel)

HOPKINS und POLAND (1942) erzielten zwar im Fütterungsversuch (12 - 35 ml Kulturfiltrat) bei acht Tage alten Ferkeln (2,1 - 2,5 kg) keine positiven Resultate, doch kam es nach intraperitonealer Verabreichung von 3 - 4 ml Filtrat/kg Körpergewicht bei 53 von 57 Ferkeln (93%) zum Erbrechen - zu- meist innerhalb von 30 bis 90 Min., in Ausnahmefällen erst nach drei Std. In anschließenden vergleichenden Untersuchungen mit Affen und Ferkeln beobachteten die Autoren, daß zwar die Ferkel (2,1 - 4,3 ml Filtrat/kg Körpergewicht i.p.) alle erbrachen, bei den 2,7 - 3,6 kg schweren Affen diese Reaktion aber weder bei peroraler Verabfolgung von 50 ml noch bei intraperitonealer Applikation von 2,5 - 6,0 ml/kg Körpergewicht auftrat. Bei der Testung von autoklavierten Kulturfiltraten "enterotoxinogener" Stämme sowie unbeimpfter Bouillon wurden keine falsch-positive Resultate erzielt. Aus diesen Gründen wie auch wegen der niedrigen Anschaffungs- kosten und leichten Verfügbarkeit sahen HOPKINS und POLAND (1942) Ferkel als geeignete Versuchstiere an. Aufgrund wahrscheinlichkeit~~smathematischer~~ Berechnungen kamen die Autoren zu dem Schluß, daß bei paralleler Testung von drei Tieren die Wahrscheinlichkeit, daß probenbedingte falsch- positive Ergebnisse bei allen drei Tieren auftreten, nur 2,6% beträgt. Infolgedessen sei bereits ein positives Ergebnis bei einem von drei Ferkeln als statistisch signifikant anzusehen. Dieser Test hat sich jedoch nicht bewährt (ROBINTON, 1949).

2.2.10. Hühnerembryonen

Das bebrütete Hühnerei dient in der Bakteriologie als ein häufig be- nutztes Versuchsobjekt und wurde von HAMMON (1941) sowie später von KIENITZ und Mitarbeitern bzw. DE WAART, VAN AKEN und POWW (1972) auf seine Eignung zum Enterotoxinnachweis getestet. Während HAMMON (1941) keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Hühnerembryonen fest- stellen konnte, berichteten KIENITZ und PREUNER (1958), daß ein spezi- fischer Nachweis enterotoxinhaltiger Kulturfiltrate an 9 1/2, 12 bzw.

16 Tage alten Hühnerembryonen nicht möglich sei, da "nichtenterotoxino-gene" Kulturfiltrate ebenfalls ein Absterben der Embryonen bewirkten. Es zeigte sich dann jedoch, daß nach 30minütiger Erhitzung auf 100°C nur noch Kulturfiltrate enterotoxinogener Stämme 9 - 10 Tage alte Hühner-embryonen schädigten und zum Absterben brachten (KIENITZ, 1958 b). In einer weiteren Publikation wiesen KIENITZ und PREUNER (1959) auf die Ab-hängigkeit der Ergebnisse von der Jahreszeit, dem Eigewicht, dem Alter der Embryonen, der Dosis der injizierten Filtrate sowie dem α - und β -Hämolytintiter der Filtrate hin. Abschließend vertrat KIENITZ (1962) die Meinung, daß die Resultate im Hühnerembryonen-Test, der auch von PÖHN und KIENITZ (1960) eingesetzt wurde, nicht immer eindeutig genug sind und der Test daher dem Affenfütterungstest bzw. Kätzchentest unter-legen sei. DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) registrierten zwar eben-falls positive Ergebnisse, doch waren die hierfür erforderlichen Entero-toxinkonzentrationen höher als bei anderen, vergleichsweise mitlaufenden biologischen Tests. Infolgedessen waren die Autoren ebenfalls der Meinung, daß dieser Test nicht optimal zum Enterotoxinnachweis geeignet ist. Hinzu kommt, daß der technische Aufwand für Tests an Hühnerembryonen groß ist (OBIGER, 1961).

2.2.11. Fische

Untersuchungen an Fischen scheinen bisher nur von RAJ und LISTON (1962) sowie DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) durchgeführt worden zu sein, ohne daß sie jedoch zufriedenstellende Ergebnisse erbracht hätten. So gelang es RAJ und LISTON (1962) selbst bei Konzentrationen von bis zu 200 mcg Enterotoxin B nicht, bei *Tilapia zilli*, einem tropischen Fisch, irgendwelche Wirkungen zu provozieren. Auch die von DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) für *Poecilia reticulata* (Guppies), *Macropodus opercularis* (Paradiesfisch) bzw. *Brachydanio rerio* (Zebrafisch) wiedergegebenen Resultate deuten darauf hin, daß sich diese Arten - eventuell mit Aus-nahme von *Poecilia reticulata* - nicht für den Nachweis von Entero-toxin A bzw. B eignen.

2.2.12. Frösche

Die Eignung von Fröschen zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin wurde u.a. von ROBINTON (1949, 1950), EDDY (1951), MERCIER et al. (1951), PISU (1951), SURGALLA, BERGDOLL und DACK (1953), MATHESON und THATCHER (1955) sowie SEEMAN und CURIK (1955) geprüft.

ROBINTON (1949) verabfolgte im Katzentest Erbrechen auslösende Kulturfiltrate von Staphylokokken an *Rana pipiens* parenteral - in den dorsalen Lymphsack - bzw. per os direkt in den Magen; zufriedenstellende Ergebnisse wurden jedoch nur bei der oralen Applikation erzielt. Da es trotz Gegenperistaltik des Magens nicht zum Erbrechen kam, wurden unter dem Symptomenkomplex "Spasmus" zusammengefaßte Reaktionen unterschiedlicher Art (Schluckbewegungen, Gähnen, Hervortreten der Augen, gelegentlicher Schleimauswurf, Wischen und Streicheln des Kopfes bzw. der seitlichen Körperpartien mit Vorder- bzw. Hinterextremitäten) als positiver Ausfall des Tests gewertet. Zumeist trat der Spasmus 3 - 4 Std. nach Verabfolgung enterotoxinhaltiger Kulturfiltrate auf, obwohl derartige Reaktionen auch bereits nach 45 Min. oder erst nach 7 Std. registriert wurden. Als weitere, diese zuweilen recht lange Reaktionszeit verkürzende Methode wurde von ROBINTON (1949) das Auftropfen des Filtrates in den freigelegten Magen des dekapitierten Frosches beschrieben. Falschpositive Ergebnisse wurden nie beobachtet. Auffällig war, daß die Frösche währen der Monate Dezember und Januar nicht und im November nur vermindert auf die Verabreichung enterotoxinogener Kulturfiltrate reagierten (ROBINTON, 1950). MERCIER et al. (1951), PISU (1951) sowie SEEMAN und CURIK (1955) bestätigten die gute Eignung von Fröschen (*Rana viridis*, *Rana fusca*, *Rana esculenta* bzw. *Hyla arborea*) zum Nachweis enterotoxinhaltiger Substrate, zumal falschpositive Ergebnisse nicht auftraten. Dabei gab PISU der Art *Hyla arborea* den Vorzug, da die Reaktionen etwas charakteristischer waren. Andere italienische Autoren (z.B. CECCARELLI und DEL FRANZIA, 1952; DE BLASI, 1954) teilten hinsichtlich der besonders guten Eignung von *Hyla arborea* nicht die Meinung von PISU (1951) und schlugen statt dessen die Verwendung von *Rana* *mediante* vor.

EDDY (1951) kam sowohl mit dem von ROBINTON (1949, 1950) eingesetzten *Rana pipiens* als auch mit *Rana pipiens sphenocephalus* sowie *Rana clamitans* zu entgegengesetzten Resultaten wie die bisher genannten Untersucher. Sie stellte weder bei nichtkonzentrierten noch bei konzentrierten Kulturfiltraten eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Froschtest und Kätzchentest (DOLMAN und WILSON, 1940) fest. Aufgrund ihrer Untersuchungen kam EDDY zum Schluß, daß der Spasmus der Frösche eine unspezifische Reaktion auf verschiedene Substanzen besonders visköser Natur ist und auch unterschiedlich häufig - in Abhängigkeit von der Jahreszeit - auftreten kann. Bei dekapitierten Fröschen wurde außerdem die Gegenperistaltik des Magens bereits vor Zugabe "enterotoxinhaltiger" Filtrate sichtbar (Dekapitationsschock). Auch SURGALLA, BERGDOLL und DACK (1953), MATHESON und THATCHER (1955) sowie THATCHER und ROBINSON (1962) beurteilten den Froschtest als unzuverlässig, da die Reaktionen der Frösche (*Rana pipiens*) gegenüber "enterotoxinhaltigen" Kulturfiltraten widersprüchlich war und offensichtlich in keinem Zusammenhang mit deren Dosierung standen. Hinzu kam, daß auch die Applikation von physiologischer Kochsalzlösung und anderen nichtenterotoxinogenen Substanzen positive Reaktionen auslösen.

Die einander stark widersprechenden Ergebnisse lassen somit den Froschtest zumindest als sehr problematisch erscheinen (KIENITZ, 1958 c). Auch SEDLAK und PRUCHOVA (1958) enthielten sich eines endgültigen Urteils, obwohl SEDLAK (1957) zuvor den Test erfolgreich durchgeführt hatte - ohne ihn allerdings ausdrücklich als vollkommen verläßlich zu bezeichnen.

HOLTMAN und PETERSON (1952) verwendeten für den Enterotoxinnachweis nicht lebende Frösche, sondern ein Nerv-Muskelpräparat (N. ischiadicus und M. gastrocnemius). Wenn zwecks Ausschaltung der Hämolytine erhitzte Kulturfiltrate auf das freie Ende des N. ischiadicus getropft wurden, kontrahierte sich der Muskel augenblicklich. Ungeklärt blieb zwar, ob die nachgewiesene neurotoxische Substanz identisch mit dem "Gastroenterotoxin" ist, doch riefen nichtenterotoxinhaltige Filtrate, Ringer-

lösung und unbeimpfte Nährmedien keine Reaktionen hervor. Vorteilhaft war, daß das Nerv-Muskelpreparat zu wiederholten Malen verwendet werden konnte, wenn es nach dem Test jeweils gut mit Ringerlösung abgespült wurde.

Auf den Froschspermatest (KRÜGER, STOJANOW und MEESER, 1965 und 1968) wird im folgenden Abschnitt (2.2.13.) eingegangen.

2.2.13. Spermien von Wirbeltieren

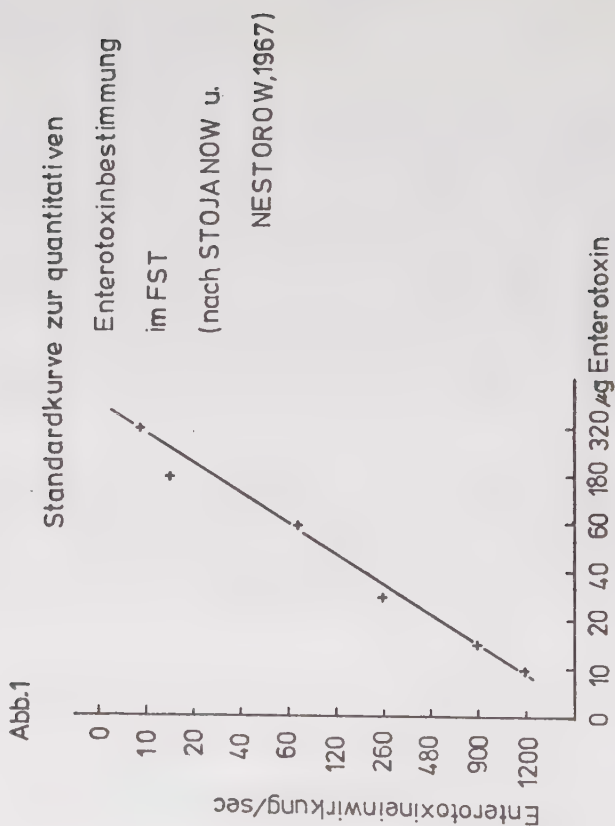
Über die Anwendung von Sperma zum Nachweis von Enterotoxin wurde erstmals von STOJANOW (1964) berichtet. Er testete die Wirkung der von den Staphylococcus aureus-Stämmen S 6 bzw. 196 produzierten Enterotoxine gegenüber in Natriumcitratpuffer 1:5 verdünntem Sperma vom Rind, Schwein bzw. Menschen. Die Beweglichkeit der Rinderspermien wurde durch Enterotoxinzugabe (50 - 6000 mcg/ml) in 1 - 3 Min. stark herabgesetzt. Konzentrationen über 1 mg/ml hemmten die Beweglichkeit augenblicklich. In der enterotoxinfreien Kontrolle waren nach 60 Min. bei 30°C noch 80% der Spermien beweglich. Schweinespermien verloren bei niedrigen Enterotoxinkonzentrationen schneller die Beweglichkeit, allerdings nahm auch die Anzahl der beweglichen Spermien in der Kontrolle stärker ab (nach 60 Min. nur noch weniger als 50% beweglich). Auffällig war, daß 5 - 10% der menschlichen Spermien noch 40 Min. nach Zugabe von 1 - 6 mg Enterotoxin/ml beweglich waren, während die Beweglichkeit in der enterotoxinfreien Kontrolle erheblich schneller abnahm als bei Rinder- bzw. Schweinespermien und sich nur unwesentlich von jener der Probe mit 50 mcg Enterotoxin/ml unterschied. Späteren Angaben (MEESER und STOJANOW, 1968) ist zu entnehmen, daß Rinder-, Schweine- bzw. Menschensperma zum Enterotoxinnachweis ungeeignet ist, während sich Froschspermien als am besten geeignet erwiesen hätten.

Aufgrund der besonderen Empfindlichkeit der Froschspermien (STOJANOW und NESTOROW, 1967) wurde von KRÜGER, STOJANOW und MEESER ein auf der Verwendung von Spermaejakulaten von Amphibien, z.B. Bufo bufo, Rana esculenta,

beruhendes Verfahren entwickelt, das 1965 in der DDR und 1968 in den USA patentiert wurde. Nach Feststellung des Prozentsatzes der beweglichen Spermien in dem aus der Kloake entnommenen Sperma (normalerweise 90 - 95%) werden 0,02 ml Sperma mit 0,02 ml des zu untersuchenden, gereinigten und 30 Min. auf etwa 56°C erhitzten Materials vermischt. Staphylokokken-Enterotoxin wirkt als Neuroparalytikum auf die Spermien (STOJANOW, 1964; MÜLLER, 1969; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972). Nach STOJANOW (1964) wirkt es wahrscheinlich auf die Verbindung des Mittelstücks mit dem Kopf ein. Der toxische Effekt bedingt dann entsprechend der Konzentration des Enterotoxins eine Abnahme der Beweglichkeit der Spermien um 10 - 90% in einem Beobachtungszeitraum von 10 Sek. bis 20 Min. (KRÜGER, STOJANOW und MEESER, 1965 und 1968; STOJANOW und NESTOROW, 1967). Der ermittelte Prozentsatz soll dann im Verhältnis zur vorher vorhandenen Beweglichkeit der Spermien einen exakten Aufschluß über die Enterotoxinkonzentration in mcg/ml ergeben (KRÜGER, STOJANOW und MEESER, 1965 und 1968; STOJANOW und NESTOROW, 1967; MEESER und STOJANOW, 1968; MÜLLER, 1969 a und b; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972). Nach STOJANOW und NESTOROW (1967) brachten 10 mcg 98% reinen Enterotoxins/ml die Bewegung von Froschspermien in 1200 Sek. zum Stillstand, während 320 mcg/ml denselben Effekt augenblicklich ergaben (Abbildung 1).

Die Publikation von DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) enthält keine Angaben zur Eignung und Empfindlichkeit der laut Material und Methodik in die umfangreichen Vergleichsuntersuchungen miteinbezogenen Froschspermien; die geringe Sensitivität von Rindersperma wurde jedoch bestätigt.

Angaben, ob der Beweglichkeitsverlust der Froschspermien innerhalb der erwähnten kurzen Zeit spezifisch für Staphylokokkenenterotoxin ist, sind nicht bekannt. STOJANOW (1964) deutete an, daß wiederholt eine hemmende Wirkung von bakteriellen Abbauprodukten auf den Stoffwechsel von Spermien beobachtet worden sei, ohne dabei anzugeben, inwieweit dies



auch für Froschsperma zutrifft. (Nach PETROFF (1962) betrug z.B. die Überlebensdauer von Büffelsperma bei 20×10^6 gramnegativen Keimen/ml noch 90 Minuten (450 Minuten bei der Kontrolle), bei grampositiven Keimen war die Verminderung der Überlebensdauer der Spermien jedoch weit weniger stark ausgeprägt.) Schließlich bleibt zu berücksichtigen, daß nach ROLLE und KALICH (1964) toxische Colikeime Spermazellen agglutinieren und sich dabei anfangs zuckende Bewegungen der Spermien zeigen, die später völlig aufhören. Da Bullensperma zu dickflüssig ist und dadurch die Ablesung der Reaktion erschwert, wurde für diesen Zweck Hundesperma eingesetzt; Froschsperma wurde nicht geprüft.

2.2.14. Krebse

Krebse scheinen aufgrund der Untersuchungsergebnisse verschiedener Autoren ebenfalls nicht zum Enterotoxinnachweis geeignet zu sein. TERPLAN, SOMMERFELD und ZAADHOF (1972) prüften Muschelkrebse (Ostracoda), DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) Eier von Salzkrebsen (Artemia) erfolglos auf Veränderungen, selbst bei der relativ hohen Konzentration von 1 mg/ml.

Nach STOJANOW, MEESER und ANWAND (1967) weisen die ebenfalls den Crustacea zugehörigen Wasserflöhe (*Daphnia magna* STRAUS) gegenüber 20% reinen Enterotoxin A- bzw. -B-Präparaten (10 bis 500 mcg/ml) keine spezifische Empfindlichkeit auf. Ähnliche Veränderungen der optomotorischen Reaktionen wie auch der Bewegungsdynamik (Prodromalstadium, Drehbewegungen um die Achse, Kreiselbewegungen, Tremor, Exitus) riefen auch pH-Wert des Mediums, Spuren des zur Anzüchtung der Staphylokokken verwendeten Nährmediums, α -Hämolysin bzw. Koagulase hervor. Auch DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) sehen keine Möglichkeit, Wasserflöhe zum Enterotoxinnachweis einzusetzen, da diese dem Enterotoxin gegenüber relativ resistent sind.

2.2.15. Insekten

Versuche mit Insekten (Imagines, Larven, Eier) scheinen nur von TERPLAN, SOMMERFELD und ZAADHOF (1972) sowie DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972)

durchgeführt worden zu sein. TERPLAN, SOMMERFELD und ZAADHOF (1972) verbrachten Mückenlarven der Gattung *Culex* in enterotoxinhaltige Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen und beobachteten insbesondere die Darmmotorik bei den Larven. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob die Entleerung der gefüllten Darmabschnitte unter dem Einfluß des Enterotoxins in ihrem zeitlichen Ablauf verändert wird. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen Test- und Kontrolltieren, selbst dann nicht, wenn die Mückenlarven zuvor einer Hungerkur unterzogen wurden bzw. mit Histamin oder Hyaluronidase vorbehandelt wurden. DE WAART, VAN AKEN und POUW verwendeten für die Vergleichsuntersuchungen Heuschrecken (*Locusta migratoria migratorioides*, *Schistocerca gregaria*), Küchenschaben (*Gromphradorhina portentosa*), Raupen (*Philosamia cynthia*) sowie Eier der Wanze *Dysdercus vólkeri*. Die Enterotoxinlösungen wurden den Imagines injiziert bzw. auf die Eier aufgetropft. Es stellte sich jedoch heraus, daß keines der Versuchsobjekte zum Enterotoxinnachweis geeignet ist, am ehesten noch die Heuschrecke *Locusta migratoria*, die ab 20 emetischen Dosen (Katzentest) Enterotoxin A positiv reagierte.

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen kann der Schluß gezogen werden, daß Insekten keine Bedeutung zum Nachweis von Enterotoxin zukommt.

2.2.16. Nematoden

Die Untersuchungsergebnisse von DEL VALLE (1960) lassen vermuten, daß die freilebende Nematode *Pelodera* (*Rhabditis*) *strongyloides* zum biologischen Nachweis von Enterotoxin eingesetzt werden kann, da ungereinigte Kulturfiltrate mit 28 mcg Enterotoxin B/ml die Schwimmbewegungen deutlich veränderten und es nach 30 - 60 Min. zu einer Paralyse kam. Bei Verwendung von 20% bzw. 80% reinem Enterotoxin traten diese Effekte bei 10 mcg/ml bzw. 0,8 mcg/ml auf.

Diesen positiven Ergebnissen stehen die Angaben von SUGIYAMA (1960), ANGELOTTI (1962), CHANG und HALL (1963) sowie STOJANOW, ANWAND und MEESER (1967) entgegen. SUGIYAMA (1960) konnte bei der Wiederholung der von DEL VALLE (1960) beschriebenen Versuche keine spezifische tödliche Wirkung auf *Rhabditis strongyloides* feststellen, während ANGELOTTI (1962) zwar ähnliche toxische Effekte wie DEL VALLE beobachtete, diese aber auch bei Filtraten nichtenterotoxinogener Staphylokokken wie auch unbeimpfter Nährmedien auftraten. In Fortsetzung der von ANGELOTTI begonnenen Versuche, die sich auch auf *Rhabditis limicola*, *Diplogaster nudicautilus*, *Diplogaster* sp. und eine *Tricephalobus*-Spezies erstreckten, registrierten CHANG und HALL (1963), daß die Beweglichkeit der Nematoden durch 98% reines Enterotoxin B in Konzentrationen von 10 - 1000 mcg/ml noch nach 72 Std. nicht eingeschränkt war. Bei ungereinigten Kulturfiltraten von *Staphylococcus aureus* S 6 (mit ca. 28 mcg Enterotoxin/ml) bzw. von nichtenterotoxinogenen Staphylokokkenstämmen reagierten die Nematoden dagegen ebenso wie bei unbeimpften Nährmedien mit Veränderung ihrer Beweglichkeit; nach einiger Zeit waren die Nematoden schließlich unbeweglich. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen STOJANOW, ANWAND und MEESER (1967) mit *Rhabditis oxycerca* de Man bzw. *Pannagrellus redivivus* Goody. Sowohl durch Hungerkur vorbereitete und mit Hylase bzw. bakterieller Protease behandelte als auch unvorbereitete Mischkulturen (adulte und Larvenformen) zeigten gegenüber 20% reinem Enterotoxin A bzw. B selbst in Konzentrationen von 1 - 22 mg/ml ausgesprochene Resistenz.

2.2.17. Protozoen

McINTOSH und OUGGAN (1965) testeten 52 repräsentative Protozoen verschiedener Ordnungen auf ihr Verhalten gegenüber Enterotoxin B. Zwar reagierten Organismen aus 12 Ordnungen positiv (Lysis, Beweglichkeitsverlust) gegenüber dem verwendeten enterotoxinhaltigen Staphylokokkenfiltrat (z.T. sogar auch gegenüber unbeimpftem bzw. mit nichtenterotoxinogenen Stämmen beimpftem Nährmedium), doch war bei gereinigtem Enterotoxin B kein Effekt zu verzeichnen. Es wurde daher vermutet, daß

die Reaktion der Protozoen nicht spezifisch für Enterotoxin ist, sondern durch andere unbekannte Faktoren (evtl. Salzgehalt, Osmose) bedingt sei. DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) konnten bei den Protozoen *Crithidia fasciculata*, *Euglena gracilis*, *Ochromonas danica*, *Ochromonas malhamensis* sowie *Tetrahymena pyriformis* ebenfalls keine Wachstumshemmungen durch geringe Mengen gereinigten Enterotoxins A bzw. B erzielen; positive Ergebnisse wurden nur bei extrem hohen Konzentrationen beobachtet.

2.2.18. Mikroorganismen

BRAYMEN (1964) prüfte das Verhalten von 170 Bakterien, Schimmelpilzen und Aktinomyzeten - nähere Angaben wurden nicht gemacht - gegenüber gereinigtem Enterotoxin B. Zu diesem Zweck wurden Papierblättchen, die mit wässerigen Enterotoxinlösungen (10 bzw. 100 mcg/ml) getränkt worden waren und ca. 0,1 ml aufnahmen, auf die beimpften Nährböden aufgelegt. Nach bis zu fünftägiger Inkubation konnten jedoch keine eindeutig enterotoxinbedingten Wachstumshemmungen registriert werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch TERPLAN, SOMMERFELD und ZAADHOF (1972) sowie DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972). TERPLAN, SOMMERFELD und ZAADHOF (1972) testeten *B. subtilis* (BGA), *B. stearothermophilus* (Kundrat), *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* (C 953), *B. megaterium* (ATCC 25848), *B. cereus* (ATcc 11778) und *S. lutea* (ATcc 9341) gegenüber enterotoxinogenen und nichtenterotoxinogenen Staphylokokkenstämmen und reinem Enterotoxin (Typen A, B und C) in Konzentrationen bis zu 1 mg/ml. Teilweise positive Resultate stellten sich bei weiterer Untersuchung als unspezifisch heraus. DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) beobachteten weder bei *B. subtilis* und *E. coli* noch bei *Chlorella vulgaris* und *Chlorella pyrenoidosa* Wachstumshemmungen im klinisch interessanten Bereich von Enterotoxin A und B. Gleiches galt auch für *Saccharomyces carlsbergensis* und *Saccharomyces cerevisiae* (DE WAART, VAN AKEN und POUW, 1972).

2.2.19. Zellkulturen

Die Prüfung von Zellkulturen auf ihre Eignung zum Nachweis von Enterotoxin erbrachte z.T. widersprechende Ergebnisse. Während z.B. MILONE (1962), KIENITZ und SCHMELTER (1964) sowie HALLANDER und BENGTSSON (1967) aufgrund ihrer Untersuchungen glauben, daß Enterotoxin mit Zellkulturen nicht nachweisbar ist, kommen GUERIN, JACKSON und MORGAN (1962), SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS (1966, 1967), GRIGOROVA und DANON (1968), URBACH, DEHRING und BRUNNEMANN (1968), SCHAEFFER (1970), RAKAROWA, STEFFANOWA und STANKOWA (1971) sowie DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) zu positiven Resultaten. Im einzelnen wurden folgende Beobachtungen angeführt:

MILONE (1962) fand bei der Testung der Zelllinien H Ep-2 und HeLa (aus menschlichen Carcinomen) gegenüber unterschiedlich reinem Enterotoxin (von Staphylococcus aureus S 6), daß zwar cytopathogene Effekte auftraten, diese aber durch thermolabile Substanzen ausgelöst wurden. Da die cytopathogenen Effekte außerdem mit zunehmendem Reinheitsgrad der Enterotoxine abnahmen und das cytotoxische Prinzip durch Antienterotoxin nicht neutralisiert werden konnte, schloß MILONE, daß "Cytotoxin" und "Enterotoxin" verschiedene Substanzen seien. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch KIENITZ und SCHMELTER (1964) sowie HALLANDER und BENGTSSON (1967). Erstere registrierten nur bei ungereinigtem, nicht aber bei gereinigtem Enterotoxin schädigende Effekte auf Affennieren-Zellkulturen. Letztere, die u.a. primäre HeLa-, menschliche Nieren-, menschliche embryonale Colon-, Kälbernieren- und Affennieren-Zellkulturen sowie Erythrozyten einsetzten, sahen ebenfalls nur bei ungereinigtem Enterotoxin (von Staph. aureus S 6 bzw. 196) cytopathogene Effekte, nicht aber bei gereinigtem Enterotoxin. Auffällig ist, daß alle Untersucher, die negative Resultate registrierten, Medien mit Kälberseren verwendet hatten, das nach SCHAEFFER (1970) eine negative Reaktion gegenüber Enterotoxin bedingt.

Nach GUERIN, JACKSON und MORGAN (1962) zeigt hochgereinigtes Enterotoxin bei Verwendung von embryonalen Herzfibroblasten cytopathogene Effekte, die sich von jenen des α -, β - und δ -Hämolysins deutlich unterscheiden - z.B. durch die Form der degenerierten Zellen. SCHAEFFER, GABLIKS und CALITIS (1966) setzten menschliche embryonale Darmzellkulturen (Henle) 96 - 99% reinem Enterotoxin B aus und beobachteten ebenfalls einen cytopathogenen Effekt: 50% der Monozellschicht wurden durch 40 - 60 mcg/ml verändert. Dieser Effekt konnte durch Zusatz von Antienterotoxin B unterbunden werden, wurde aber u.a. durch Bi-Carbonat- bzw. Kalziumgehalt des Mediums, Anwesenheit von Serum bzw. Streptomycin und Penicillin im Medium sowie insbesondere durch das Alter der trypsinisierten Zellkulturen beeinflusst. Ein cytopathogener Effekt war nur dann zu registrieren, wenn das Enterotoxin frühestens nach 48 Std. Wachstum zugesetzt wurde. Später stellten die gleichen Autoren (1967) fest, daß die Trypsinierung der Zellkulturen für die ca. 48stündige Resistenz gegenüber Enterotoxin B verantwortlich war.

Schließlich konnte SCHAEFFER (1970) aufzeigen, daß der cytopathogene Effekt von Enterotoxin B z.B. bei menschl. embryonalen Darm-, HeLa- bzw. HEp-2-Zellkulturen nur dann nachweisbar ist, wenn die Zellen im Medium mit Humanserum gezüchtet werden, nicht aber im Medium mit Kälberserum bzw. Pferdeserum. Die cytopathogenen Wirkungen sind nach SCHAEFFER zumeist nicht vor 8 Std. nach Zugabe des Enterotoxins sichtbar und sind nicht letal; nach Entfernung der Enterotoxinlösung kann es zu einer vollständigen Regeneration mit Wachstum der Zellen kommen. Trotz der guten Ergebnisse mit Zellkulturen wurde dieses System von diesem Autor nicht zum Nachweis von Enterotoxin in Lebensmitteln empfohlen, da es wenig empfindlich ist, viel Zeit vergeht, bis das Enterotoxin in erforderlichem Ausmaß gereinigt vorliegt und viele variable Faktoren das Ergebnis beeinflussen können.

Im Gegensatz dazu sind GRIGOROVA und DANON (1968) sowie RAKAROWA, STEFFANOWA und STANKOWA (1971) der Ansicht, daß Zellkulturen für die

Diagnose von Staphylokokken-Intoxikationen nützlich sein können. Nach GRIGOROVA und DANON üben von *S. aureus* (Stamm 254, Food Research Institute) gewonnene und zur Inaktivierung von α -Hämolysin 20 Min. auf 80°C erhitzte Filtrate innerhalb von 20 Std. starke cytopathogene Effekte auf primäre menschl. embryonale Fibroblast- bzw. Nierengewebezellkulturen sowie auf carcinomatöse bzw. normale Zellen aus. Gleiches galt für weitere bei Lebensmittelintoxikationen isolierte Staphylokokken-Kulturfiltrate - allerdings waren die degenerativen Veränderungen erst etwas später zu registrieren. Von RAKAROWA und STEFFANOWA und STANKOWA (1971) wurde die cytopathogene Wirkung von acht im "kitten-test" positiver *S. aureus*-Kulturfiltrate in primären Gewebekulturen menschl. embryonaler Darmfibroblasten und in Passage der Zelllinien HeLa, HEP-2 und Heart geprüft. Die Eliminierung von α -Hämolysin erfolgte durch 30minütige Erhitzung auf 100°C bzw. Zusatz von Ascorbinsäure. Alle Kulturfiltrate - ein *S. aureus*-Stamm wurde später als Bildner von Enterotoxin A identifiziert - zeigten starke cytotoxische Effekte auf alle Gewebekulturen. Dabei erwiesen sich alle Gewebekulturen als gleich empfindlich.

Zu etwas abweichenden Ergebnissen hinsichtlich der Sensitivität verschiedener Zellkulturen kamen URBACH, OEHRING und BRUNNEMANN (1968) sowie DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972). Erstere testeten menschliche Amnionzellen (FL), HeLa-Zellen bzw. Hühnerfibroblasten-Frischzellen. Zum Enterotoxinnachweis wurde der Überstand zentrifugierter und 30 Min. auf 100°C erhitzter Bouillonkulturen verwendet. FL-Zellen waren am besten geeignet, am wenigsten empfindlich erwiesen sich die Hühnerfibroblasten-Frischzellen. Falschpositive Ergebnisse wurden nicht registriert. Nach DE WAART, VAN AKEN und POUW (1972) erwiesen sich nur menschl. embryonale Lungen- bzw. HeLa-Zellen als gut geeignet, während bei anderen Zellkulturen (Mäuse-Fibrinoblasten- sowie Rhesusaffen-Nieren-Zellen) relativ hohe Enterotoxinkonzentrationen zur Auslösung von cytopathogenen Effekten erforderlich waren.

2.2.20. Gewebe

McINTOSH und WATT (1971) prüften, ob und inwieweit anaphylaktische Reaktionen gegenüber Enterotoxin B sensitivierten Gewebes zum in vitro-Nachweis dieses Toxintyps genutzt werden können. Bei dem Gewebe handelte es sich um Uterushornsegmente bzw. zerkleinertes Lungengewebe vom Meerschweinchen sowie Thrombozyten vom Kaninchen. Aus ihren Untersuchungen ziehen die Autoren den Schluß, daß diese Art des Enterotoxinnachweises sehr sensitiv und auch spezifisch ist. Enterotoxin B konnte ohne Schwierigkeiten in Mengen von weniger als 0,1 mcg/ml ermittelt werden, auch in Anwesenheit anderer Proteine.

2.3. Immunologische Verfahren

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die auf der spezifischen in vitro-Reaktion von Antigen und Antikörper beruhen. Auf eine Wiedergabe der einzelnen Daten hinsichtlich Empfindlichkeit und Dauer des Tests, Vor- bzw. Nachteile etc. soll an dieser Stelle verzichtet werden. Ausführliche Angaben hierzu finden sich u.a. in den kürzlich publizierten Übersichtsreferaten von HOLBROOK und BAIRD-PARKER (1975) sowie SOMMERFELD und TERPLAN (1975). Nach Ansicht der letztgenannten Autoren läßt sich die Ermittlung der unterschiedlichen Enterotoxintypen am schnellsten in der Gegenstromelektrophorese durchführen, während sich die einfache radiale Immundiffusion nach MANCINI, CARBONARA und HEREMANS (1965) am besten für den anschließenden quantitativen Nachweis eignet. Bei Verzicht auf elektrophoretische Techniken wird die von diesen Autoren beschriebene Modifikation des Ouchterlony-Tests empfohlen, mit der sich noch 0,1 mcg Enterotoxin/ml nachweisen lassen sollen.

2.4. Nachweis von Enterotoxinen in Lebensmitteln

Die gebräuchlichen Nachweisverfahren sind für die direkte Ermittlung der geringen in Lebensmitteln vorhandenen Enterotoxinmengen zu wenig empfindlich (CASMAN und BENNETT, 1965; HALL, ANGELOTTI und LEWIS, 1965). Es sind daher verschiedene Methoden für Extraktion und Konzentration sowie Reinigung der Enterotoxin verarbeitet worden. Prinzipiell beruhen diese Methoden auf selektiver Adsorption des aus dem Lebensmittel extrahierten Enterotoxins an Ionenaustauscher bzw. auf selektiver Entfernung störender Lebensmittelbestandteile mittels chemischer oder physikalischer Methoden. Da bei der letztgenannten Verfahrensart die Lebensmittelbestandteile jedoch nicht in ausreichendem Maße entfernt werden können, ist die Konzentrierung des Enterotoxins in dem für den Nachweis erforderlichen Ausmaß nicht möglich. Die Adsorption am Ionenaustauscher ermöglicht demgegenüber eine bessere Trennung von Enterotoxin und Lebensmittel und auch eine bessere Konzentrierung des Toxins. Da bei eiweißreichen Lebensmitteln allerdings auch Lebensmittelbestandteile vom Austauscher adsorbiert und später eventuell mit dem Enterotoxin eluiert werden können, empfiehlt sich eine Kombination der beiden Prinzipien zur Trennung von Enterotoxin und Lebensmitteln (CASMAN, 1967). Derartige Extraktionsverfahren sind u.a. beschrieben worden von CASMAN und BENNETT (1965), HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1965), READ et al. (1965 a und b), STOJANOW und SCHENK (1966 und 1970), CASMAN (1967), ZEHREN und ZEHREN (1968), BARBER und DEIBEL (1972) sowie REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974). Die wichtigsten Details der verschiedenen Verfahren sind in der folgenden Übersicht zusammengefaßt. Weitere Einzelheiten können dem Literaturteil von MEYER (1973) sowie insbesondere den jeweiligen Originalarbeiten entnommen werden. An dieser Stelle soll nur auf einige Angaben zu dem von STOJANOW und SCHENK (1966, 1970) erarbeiteten Verfahren hingewiesen werden. (Die einzelnen Schritte dieser Methode, bei der der Nachweis der Enterotoxine qualitativ im Ringpräzipitationstest (SIROTININA, 1962) bzw. quantitativ im Froschspermatest (KRÜGER, STOJANOW

Übersicht 2: Verfahren zur Extraktion von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln

Extraktion mit	Konzentrierung mit	Reinigung mit	Elution mit	Konzentrierung mit	Autor
Phosphatpuffer (PB)	-	Amberlite	0,2 m PB	Polyvinylpyrrolidon (PVP)	HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1966)
Säure, Chloroform	PVP	Säurefällung, Erhitzung, Chloroformextraktion		-	READ et al. (1966 a, b)
NaCl-Lösung	Polyäthylenglykol (PEG)	DMC	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG	CASMAN und BENNETT (1966)
NaCl-Lösung, Chloroform	PEG	DMC [*]	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG, Lyophilisation	CASMAN (1967)
NaCl-Lösung	PEG	DMC [*]	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG, PEG [*] , Lyophilisation	ZEHNEN und ZEHNEN (1968)
NaCl-Lösung, Chloroform, Säure	PEG	DMC ^{**}	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG, PEG [*] , Lyophilisation	BARBER und DEIBEL (1972)
Säure, Chloroform	-	Amberlite	0,9% NaCl in 0,15 m Na ₂ HPO ₄	PEG ^{***}	REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974)
Na ₂ HPO ₄ , Erhitzung, Säurefällung	Bio-Gel P 10	Sephadex oder Bio-Gel	0,02 m Na ₂ HPO ₄	Bio-Gel	STOJANOW und SCHENK (1966, 1970)

*) nach vorheriger Chloroformextraktion

**) nach vorheriger Chloroformextraktion, Säurezusatz und Erhitzen

***) zuvor Reinigung über Agar, danach Chloroformextraktion, Lyophilisation und Behandlung mit Trypsin.

und MEESER, 1965 und 1968) erfolgt, werden ausführlich im Rahmen der eigenen Untersuchung (3.1.2.) beschrieben.) Mit dieser Methode, die von der Herstellung des Lebensmittelextraktes bis zur Mengenberechnung des Enterotoxins nur etwa 8 - 10 Std. in Anspruch nehmen soll (STOJANOW und NESTOROW, 1967; MEESER und STOJANOW, 1968; MÜLLER, 1969 a und b; STOJANOW und SCHENK, 1970; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972), sollen Toxinmengen unter 1 mcg/g Produkt sicher nachweisbar sein (STOJANOW und NESTOROW, 1967; MÜLLER, 1969 b; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972). Bei Zusatz von reinem Enterotoxin B in Gehacktem wurde eine Wiedergewinnungsrate von 92,4% (Froschspermatest) bzw. 93,98% (Doppel-Gel-Diffusionstest) beobachtet. MEESER und STOJANOW (1968) kamen bei Milchproben allerdings zu ganz anderen Ergebnissen. So wurden z.B. bei Milchextrakten mit 5,5 bzw. 50 mcg Enterotoxin/ml im Gel-Diffusionstest nach OEDING (1953) nur 20 - 44% der zugesetzten Mengen erfaßt, mit dem Froschspermatest aber 60 - 75%. Die Überlegenheit des Froschspermatests zeigte sich nach Ansicht dieser Autoren auch darin, daß bei der Untersuchung von Trinkmilch bereits nach 8 Std. 40 mcg Enterotoxin/ml nachgewiesen wurden, mit dem Gel-Diffusionstest aber nur 10 mcg/ml (nach 144 Std.). Ähnliches wurde auch bei Joghurt festgestellt: 15 mcg/ml (Froschspermatest) gegenüber 2,5 mcg/ml (Gel-Diffusionstest). Den anderen Publikationen, in denen über den Einsatz dieses Verfahrens zum Nachweis des Enterotoxins in Milch, Milcherzeugnissen, Säuglingsnahrung, Fleisch- und Kartoffelsalat, Markenbutter, Eis, Cremetorte, Wurst, Schinken und Hackfleisch (MÜLLER, 1969 a; STOJANOW und MEESER, 1970; MÜLLER und STOJANOW, 1971; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972) berichtet wird, sind keine Angaben über Wiedergewinnungsrate, Sicherheit der Methodik etc. zu entnehmen.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methodik

Entsprechend der gestellten Aufgabe wurden die eigenen Untersuchungen in zwei Hauptabschnitte untergliedert. Im ersten Teil wurde der Frosch-spermatest (FST) nach KRÜGER, STOJANOW und MEESEER (1965, 1968) auf seine Eignung zum spezifischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin geprüft. Im zweiten Teil wurde dann getestet, ob und inwieweit das von STOJANOW und SCHENK (1966, 1970) entwickelte Verfahren der "präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln" zur Extraktion von Enterotoxin aus Lebensmitteln geeignet ist.

3.1.1. Froschspermatest (FST)

Die Durchführung dieses Tests erfolgte in Anlehnung an die Angaben des DDR-Wirtschaftspatents Nr. 44088 (KRÜGER, STOJANOW und MEESEER, 1965), des US-Patents Nr. 3408259 (KRÜGER, STOJANOW und MEESEER, 1968), der Arbeit von STOJANOW und NESTOROW (1967) sowie der Publikation von MEESEER und STOJANOW (1968).

Zur Gewinnung der spermehaltigen Ejakulate wurde 30 - 50 g schweren männlichen Fröschen der Gattung *Rana esculenta* (Fa. Robert Stein, Lauingen) 1 ml (entsprechend 50 i.E.) Prolan A (Bayer) in den dorsalen Lymphsack injiziert. Diese im Vergleich zu den Angaben der Autoren deutlich höhere Dosis wurde gewählt, da sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, daß bei der empfohlenen Dosis von nur 5 - 10 i.E. ca. 2 - 2,5 Std. vergingen, bis Spermien - häufig nur in geringer Konzentration und mit geringer Beweglichkeit - gewonnen werden konnten. Bei höherer Dosierung des Hormons konnte den Fröschen nach ca. 1 Std. mit einer Tropfpipette ca. 2 - 3 ml Ejakulat aus der Kloake entnommen werden. Das Ejakulat enthielt reichlich Spermien, von denen im allgemeinen 80 - 95% beweglich waren, und wurde höchstens bis zu 5 Minuten in einem Uhrgläschen bei ca. 16°C aufbewahrt. In Vorversuchen hatte sich ergeben, daß die Spermien

bei einer derartigen Aufbewahrung ca. 20 Minuten beweglich bleiben. Sofern aber das gewonnene Ejakulat nicht in seiner Gesamtheit, sondern nur in den für die Durchführung des Tests erforderlichen Mengen von jeweils 0,02 ml aufbewahrt wurde, war die Beweglichkeit der Spermien bereits nach ca. 12 Minuten erloschen. Die Frösche wurden frühestens nach einer dreitägigen Erholungspause zur erneuten Spermagewinnung wieder herangezogen. In der Zwischenzeit wurden sie in einem Terrarium bei ständigem Wasserzulauf gehalten; eine Fütterung erfolgte nicht.

Der FST selbst wurde in der Weise durchgeführt, daß jeweils 0,02 ml der vorher 30 Min. bei 56°C temperierten Proben nach Erkalten mit 0,02 ml des höchstens 5 Min. zuvor gewonnenen Ejakulates auf einem Objektträger (schwaches Trockensystem) vermischt wurden. Bei mikroskopischer Betrachtung wurde mittels Stoppuhr die Zeit (in Sekunden) ermittelt, innerhalb derer die Spermien ihre Beweglichkeit vollständig verloren.

3.1.1.1. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Enterotoxin A bzw. B

Bei den verwendeten Enterotoxinen handelte es sich um kommerziell vertriebene wie auch am hiesigen Lehrstuhl hergestellte Produkte: Enterotoxin B der Firmen Serva (Heidelberg) und Makor (Jerusalem) sowie Enterotoxin A und B aus eigener Herstellung.

Das von der Fa. Serva in Mengen von 5 mg gelieferte Lyophilisat soll entsprechend den Firmenangaben weniger als 1% heterologes Toxin enthalten, während im Makor-Produkt 0,36 bzw. 0,25 mg Enterotoxin/mg Substanz lyophilisiert vorhanden sein sollen. Diese Werte ließen sich im Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN, der in der von KUHN (1974) beschriebenen Art und Weise durchgeführt wurde, bestätigen. Das am Lehrstuhl hergestellte Enterotoxin B war zu 95% rein, während das Enterotoxin A nur der Reinigung mit Carboxymethylcellulose unterzogen worden war (CHU et al., 1966) und daher nur einen Reinheitsgrad von 20% aufwies. Die Enterotoxin-

konzentrationen/mg Substanz wurden ebenfalls mit Hilfe des Einfach-Gel-Diffusionstests bestimmt. Die für diesen Zweck benötigten Eichkurven waren mit von Prof. Dr. M.S. Bergdoll (USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellten standardisierten Enterotoxinen erstellt worden.

Da das Enterotoxin im Rahmen der Gewinnung aus Lebensmitteln mit 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH 6,8) eluiert wird (STOJANOW und SCHENK, 1968), wurden die Enterotoxine jeweils in diesem Puffer gelöst.

In der ersten Versuchsreihe (jeweils ca. 50 Tests) wurde der Einfluß folgender Enterotoxin B-Konzentrationen/ml (Makor-Produkt) getestet: 7200 mcg, 3600 mcg, 1800 mcg, 900 mcg, 450 mcg, 225 mcg, 112,5 mcg, 56 mcg, 28 mcg und zur Kontrolle 0 mcg. Aus den für die verschiedenen Enterotoxinkonzentrationen erhaltenden Einzelwerten wurden die jeweiligen Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet und außerdem die Regression bestimmt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde später noch geprüft, inwieweit auch niedrigere Mengen dieses Enterotoxins (15 bzw. 10 mcg/ml) auf die Beweglichkeit der Froschspermien Einfluß nehmen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde dann zu ermitteln versucht, ob sich mit den anderen zur Verfügung stehenden Enterotoxinen ähnliche Ergebnisse erzielen lassen. Für diese 15 - 20mal parallel durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Konzentrationen verwendet: 25 mcg/ml (Enterotoxin B, Serva), 4000, 2000 bzw. 1000 mcg Enterotoxin B/ml sowie 2000 bzw. 1000 mcg Enterotoxin A/ml (jeweils eigene Produktion).

3.1.1.2. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Enterotoxinlösungsmitteln und Extraktionsmitteln

Da bei einem im Rahmen anderer Untersuchungen verwendeten, in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Enterotoxin B-Präparat (Konzentration: 100 mcg/ml) die Spermienbewegung bereits innerhalb von 50 Sek. aufhörte (und nicht, wie aufgrund der vorhergehenden Versuche zu erwarten war,

erst nach ca. 510 Sek.), wurde in jeweils 20 Versuchsreihen geprüft, ob die Ergebnisse des FST auch von der zur Lösung des Toxins verwendeten Flüssigkeit abhängig sind. Eingesetzt wurden im Vergleich zum 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer: Aqua bidest., sterile physiologische Kochsalzlösung, zur Auflösung des Prolan A dienendes autosteriles Lösungsmittel (Bayer) und die auch häufig zur Anzüchtung enterotoxinbildender Staphylokokken verwendete Hirn-Herz-Bouillon (RICHTER, 1974). Des weiteren wurde die Wirkung von Esbach's Reagenz (STOJANOW und SCHENK, 1966), Chloroform (CASMAN und BENNETT, 1966; READ et al., 1966 a, b; u.a.) sowie Trypsin (REISER et al., 1974) getestet, Reagenzien, die der Extraktion und Isolierung der Enterotoxine aus Lebensmitteln dienen.

3.1.1.3. Verhalten der Froschspermien gegenüber nichtenterotoxinartigen bakteriellen Stoffwechselprodukten

Da verschiedentlich auch anderen bakteriellen Substanzen und Stoffwechselprodukten eine Wirkung auf Sperma zugeschrieben wurde (ROLLE und KALICH, 1954; ULLNER, 1957) und auch Wechselwirkungen zwischen Enterotoxin einerseits und Endotoxin gramnegativer Keime (SUGIYAMA et al., 1964; MARTIN und MARCUS, 1964) andererseits beobachtet werden konnten, wurden in weiteren Versuchen mit Endotoxin sowie Staphylokokken-Hämolysinen geprüft, inwieweit sie Froschsperma beeinflussen. Bei dem Endotoxin (*E. coli* 055: B 5 (Difco)) sowie dem α -Hämolysin (Staphylolysin-Reagenz, Behringwerke) handelte es sich um handelsübliche Präparate, während das β -Hämolysin durch Anzüchtung eines institutseigenen bovinen *Staphylococcus aureus*-Stammes gewonnen wurde, dessen Unvermögen, Enterotoxin zu bilden (Typ A, B, C, D bzw. E), mit Hilfe der "sac-culture-Technik" (DONNELLY et al., 1967) zuvor festgestellt worden war. Die Herstellung des β -Hämolysins erfolgte in Anlehnung an die von SEELEMAN und OBIGER (1956) beschriebene Methodik.

Zu diesem Zweck wurde auf pH 7,4 eingestellte, in Mengen zu 50 ml abgefüllte Nährbouillon mit einer Abschwemmung von einer Schrägagarkultur

des betreffenden Stammes beimpft. Nach 8tägiger Bebrütung bei 37°C wurde die Bouillonkultur auf 85°C im Wasserbad erhitzt, um die Staphylokokken abzutöten und das α -Toxin zu inaktivieren. Nach Abkühlung wurde für 10 Min. bei 15.000 U/min zentrifugiert, der Überstand steril filtriert und lyophilisiert.

Für die Untersuchungen wurden verschiedene Mengen an Endotoxin und Hämolsinen jeweils in 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 6,8, gelöst. Anschließend wurde der FST mit diesen bakteriellen Stoffwechselprodukten in der gleichen Weise durchgeführt wie es beim Nachweis der Staphylokokkenenterotoxine (3.1.1.) bereits beschrieben wurde. Bei der Testung des α -Hämolsins wurden außerdem mit Anti-Staphylolysin-Serum (Behringwerke) neutralisiertes α -Hämolysin sowie Anti-Staphylolysin-Serum allein eingesetzt. Als positive bzw. negative Kontrollen liefen jeweils in 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 6,8, gelöstes Enterotoxin B (900 mcg/ml) bzw. nur der Puffer ohne Enterotoxin mit.

3.1.2. Isolierung und Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin

Im zweiten Teil der Untersuchungen, der sich mit der "präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln" nach STOJANOW und SCHENK (1966) beschäftigt, wurde die dieser Publikation zugrundeliegende Methodik auf Eignung geprüft (von der ursprünglichen Versuchsmethodik abweichende Angaben (STOJANOW und NESTOROW, 1967; STOJANOW und SCHENK, 1970) sind im folgenden Schema in Klammern gesetzt):

1. Extraktion

Das Enterotoxin wird aus Lebensmitteln mit $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ im Bereich des pH-Wertes 4,0 - 7,5 extrahiert (0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer).

2. Erhitzen

Der Pufferextrakt wird für 30 - 60 Min. auf 80 - 100°C (85°C) erhitzt (und auf 40°C abgekühlt).

3. Säurepräzipitation

Esbach-Reagenz wird im Verhältnis 0,5 : 4 (1 : 2) der Probe zugesetzt. Im Anschluß an die Säurepräzipitation (nach 30 Minuten) wird zentrifugiert (30 Min. bei 3000 U/min).

4. Entfetten

Nach einer Stunde Aufbewahrung bei 4°C wird die erstarrte Fettschicht von der Oberfläche des Extraktes abgenommen.

5. Zentrifugieren

Die Probe wird mit NaOH auf den pH-Wert 5,0 - 7,0 (pH 6,8) eingestellt und bei 10.000 U/min etwa 20 Minuten zentrifugiert.

6. Dialyse und Konzentrierung

Der gelbliche Überstand wird abgegossen und mit einer Gelsubstanz - "Dextran", "Polymer" - (Bio-Gel P 10) dialysiert und konzentriert. (Nach 20 Minuten erhält man die gewünschte Konzentration. Anschließend wird 30 Min. bei 10.000 U/min zentrifugiert.)

7. Gel-Filtration

Durch ein Gelbett - "Dextran", "Polymer" - (Sephadex G-100 oder G-50 bzw. Bio-Gel P-60 oder P-100) wird das Dialysat chromatographisch aufgetrennt (Elution mit 0,02 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 6,8).

8. Rekonzentrieren

Die Fraktionen werden mit einer Gelsubstanz (Bio-Gel P-10) fünf- bis zehnfach eingeengt.

Die bei der Rekonzentrierung verbleibende Flüssigkeit wird dann auf die Anwesenheit von Enterotoxin geprüft. Empfohlen wird, zuerst mit dem Ring-Präzipitationstest (SIROTININA, 1962) serologisch den Toxintyp zu ermitteln und anschließend mit dem Froschspermatetest den Enterotoxin-gehalt quantitativ zu bestimmen (STOJANOW und NESTOROW, 1967; STOJANOW und MEESER, 1970; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972).

Bevor die Isolierung in ihrer Gesamtheit durchgeführt wurde, wurden einige Schritte in Form von Modellversuchen geprüft. Dabei wurden insbesondere die Schritte in die Untersuchungen einbezogen, die von den

Autoren wenig präzise beschrieben sind bzw. Enterotoxinverluste erwarten lassen. Als Nachweisverfahren für das Enterotoxin fanden außer dem FST auch serologische Methoden Verwendung, und zwar Einfach-Gel-Diffusionstests in der von OUDIN (1952) bzw. MANCINI, CARBONARA und HEREMANS (1965) beschriebenen Form sowie der Objektträger-Gel-Diffusionstest (CASMAN, 1967) und der modifizierte Objektträger-Gel-Diffusionstest nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975). Nähere Angaben zum OUDIN-Test bzw. CASMAN-Test finden sich bei KUHNT (1974). Angaben zur Technik des MANCINI-Tests und des modifizierten Objektträger-Gel-Diffusionstests (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) können der Publikation der letztgenannten Autoren entnommen werden.

3.1.2.1. Erhitzen

Aufgrund der wiederholten Angaben über eine thermische Beeinflussung der Enterotoxine bei höheren Temperaturen (Übersicht bei TERPLAN und ZAADHOF, 1974), insbesondere im Bereich von 80°C (SATTERLEE und KRAFT, 1969; JAMLANG, BARTLETT und SNYDER, 1971; FUNG et al., 1973), wurde geprüft, ob und inwieweit der zweite Schritt des Isolierungsverfahrens, der eine Erhitzung des Pufferextraktes für 30 - 60 Min. auf 80 - 100°C bzw. 30 Min. auf 85°C (STOJANOW und NESTOROW, 1967; STOJANOW und SCHENK, 1970) vorsieht, zu einer Inaktivierung von Enterotoxin führen kann.

Zu diesem Zweck wurde Enterotoxin B der Fa. Makor bzw. eigener Herstellung in 0,02 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH 6,8) in einer Konzentration von 900 mcg/ml bzw. 1000 mcg/ml gelöst und im Wasserbad für 30 Min. auf 85°C bzw. 100°C erhitzt. Später wurden diese Versuche mit dem Makor-Produkt in einer Konzentration von 100 mcg/ml wiederholt. Als Medium diente dabei neben dem Puffer auch Pufferextrakt aus Wurst.

Die biologische und serologische Aktivität der enterotoxinhaltigen Proben wurde mit den erwähnten Verfahren jeweils vor und nach der Erhitzung ermittelt, wobei die erhitzten Proben zuvor abgekühlt wurden.

3.1.2.2. Dialyse und Konzentration

Da die Durchführung der Dialyse und Konzentration weder in den Patenten (STOJANOW und SCHENK, 1966 und 1970) noch in der Publikation von STOJANOW und NESTOROW (1967) ausführlich beschrieben wird, erfolgte anfänglich in Anlehnung an die Angaben der Fa. Bio-Rad dieser Schritt mit Hilfe von Dialysierschläuchen (Visking) mit einem Porendurchmesser von $15 - 20 \text{ \AA}$. Diese Dialysierschläuche, die auch für die Konzentration von Enterotoxin gegenüber Polyäthylenglykol am Lehrstuhl Anwendung finden, wurden nach Füllung und dichtem Verschuß in ein Becherglas verbracht und in trockenes Bio-Gel P-10 (Bio-Rad Laboratories, 1971) eingebettet.

In wiederholten Versuchsreihen zeigte sich jedoch stets, daß die Konzentration selbst nach drei Tagen nicht in dem erforderlichen Ausmaß vonstatten gegangen war.

Da das innere Volumen des Gels neben Wasser auch niedermolekulare Bestandteile (Bio-Rad Laboratories, 1971) aufnimmt, während hochmolekulare Komponenten außerhalb der Ausschußgrenze in der Lösung konzentriert werden sollen, wurde später trockenes Bio-Gel P-10 in die zu konzentrierenden Lösungen eingerührt (MEESER und STOJANOW, 1968). Dabei wurden die erforderlichen Gelmengen jeweils unter Berücksichtigung des Flüssigkeitsaufnahmevermögens von $5,1 \text{ g/trockenes Gel}$ berechnet. Nach 20 Min. wurde das Konzentrat durch Zentrifugieren (30 Min. bei 10.000 U/min) vom Gel abgetrennt. Die Flüssigkeitsmenge war durch diese Art der Konzentration von ca. 10 ml auf ca. 1 ml eingeengt worden. Es war nun zu klären, ob bei der direkten Zugabe des Bio-Gel P-10 zu einer enterotoxinhaltigen Lösung eine Bindung des Enterotoxins an das Gel ausgeschlossen werden kann. Dazu wurden in insgesamt 10 Versuchen jeweils 10 ml Puffer mit 200 mcg Enterotoxin B (Makor) versetzt, so daß eine Konzentration von 20 mcg/ml vorlag, auf ca. 1 ml eingeengt und biologisch sowie serologisch auf den Enterotoxingehalt untersucht.

Außerdem wurde das beim Zentrifugieren zurückbleibende Gel mit 0,5 ml Puffer versetzt und anschließend ca. 5 Min. auf einem Magnetrührer gut durchgemischt. Der sich nach Absetzen des Gels bildende Flüssigkeitsüberstand wurde anschließend ebenfalls serologisch auf die mögliche Anwesenheit von Enterotoxin getestet.

3.1.2.3. Gelfiltration

Die Gelfiltration kann nach Angabe von STOJANOW und NESTOROW (1967) sowie STOJANOW und SCHENK (1970) mit Sephadex G-100 oder G-50 bzw. mit Bio-Gel P-60 oder P-100 durchgeführt werden. Zur Feststellung, welche der vier Gelsubstanzen, deren physikalische Daten in Übersicht 3 wiedergegeben sind, am besten geeignet ist, wurden insgesamt 10 Versuche mit jeweils 200 mcg Enterotoxin B/ml und Esbach's Reagenz enthaltenden 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer-Lösungen durchgeführt (statt Sephadex G-100 wurde allerdings das auch zur Reinigung von Enterotoxin B am Lehrstuhl verwendete Sephadex G-75 eingesetzt). Die Vorbereitung des Gels erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller (Bio-Rad Laboratories, USA; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden), ebenso das Packen der Säulenfüllung und deren Stabilisierung durch Auflegen eines Filterblattes auf die Geloberfläche und durch Vorspülen mit einer dem dreifachen Säulenvolumen entsprechenden Menge des 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffers pH 6,8. Das Säulenvolumen der verwendeten Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 4,5 cm (STOJANOW und NESTOROW, 1967) betrug etwa 900 ml. Vor dem Auftragen der jeweils 10 ml messenden Probe wurde die Hauptmenge des Flüssigkeitsüberstandes zunächst abgehebert, der Rest zog durch Öffnen des Auslaufhahns an der Chromatographiesäule eben in die Gelfüllung ein. Dann wurde die Problelösung bei geschlossenem Auslauf vorsichtig mit einer Pipette auf die durch das Filterblatt geschützte Geloberfläche geschichtet. Anschließend wurde der Auslauf nur so lange geöffnet, bis die Probe gerade eingezogen war. Die Geloberfläche und die mit der Probe in Berührung gekommene Rohrwand wurden mit etwas Puffer nachgewaschen und der Auslauf bis zum

Übersicht 3: Physikalische Eigenschaften von Sephadex G-50,
G-75, G-100 bzw. Bio-Gel P-60 und P-100

Gel-Typ	Perldurchmesser μ	Wasseraufnahmevermögen in ml/g trockenes Gel	Gelvolumen in ml/g trockenes Gel	Fraktionierbereich für Proteine
Sephadex				
G-50	20 - 80	5,0	9 - 11	1.500 - 30.000
G-75	40 - 120	7,5	12 - 15	3.000 - 70.000
G-100	40 - 120	10,0	15 - 20	4.000 - 150.000
Bio-Gel				
P-60	74 - 149	7,2	14,4	3.000 - 60.000
P-100	74 - 149	7,5	15,0	5.000 - 100.000

Einziehen dieser Waschflüssigkeit erneut geöffnet. Schließlich wurde der freie Säulenteil mit dem Elutionspuffer (0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 6,8) aufgefüllt, der Zulauf mit dem Elutionspufferreservoir verbunden und der Auslauf geöffnet. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde konstant auf 5 ml/Min. gehalten (STOJANOW und NESTOROW, 1967).

Die Transmission des in Fraktionen zu je 33 Tropfen (= 19,5 ml) gewonnenen Eluats wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers, Modell Isco UA 4 (Absorbance monitor) bei 277 nm (SCHANTZ et al., 1965) gemessen und mittels Schreiber registriert. Die Fraktionen, bei denen eine verminderte Transmission feststellbar war, wurden anschließend serologisch auf ihren Enterotoxingehalt getestet.

Da im Rahmen des ersten Versuchsabschnittes festgestellt worden war, daß der FST auch durch Endotoxin von *E. coli* bzw. β -Hämolysin von *Staph. aureus* beeinflusst wurde, wurde geprüft, ob es bei der Gelfiltration zu einer einwandfreien Trennung von Enterotoxin und diesen beiden Stoffwechselprodukten kommt und somit falsch-positive Reaktionen im FST ausgeschlossen werden können. Diese Frage stellt sich insbesondere auch, da die Molekulargewichte von Enterotoxin und β -Hämolysin sich nicht wesentlich unterscheiden. Für diese Versuche wurden das im Rahmen vorhergehender Untersuchungen (3.1.1.3.) produzierte Lyophilisat des β -Hämolysins bzw. das handelsübliche Endotoxinpräparat von *E. coli* O55:85 (Difco) in jeweils 10 ml Puffer gelöst und auf die in gleicher Weise wie bei der Gelfiltration des Enterotoxins vorbereitete Gelfüllung aufgetragen. Die Elution erfolgte wiederum mit 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, die Messung der Extinktion ebenfalls bei 277 nm. Fraktionen des Hämolysins mit deutlich verminderter Transmission wurden dann auf ihr Lysisvermögen auf Blutplatten getestet.

3.1.2.4. Wiedergewinnungsrate

Der letzte Teil der Arbeit bestand darin, die Leistungsfähigkeit des Verfahrens zur "präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln" im Hinblick auf die Wiedergewinnungsrate des Lebensmitteln zugesetzten Enterotoxins zu ermitteln. Im einzelnen handelt es

sich bei den Lebensmitteln um pasteurisierte Konsummilch (10 Proben), ultrahocherhitzte Konsummilch (5 Proben), Trockenmagermilch (10 Proben), Hackfleisch vom Rind (6 Proben). Die in Mengen zu 10 ml abgemessenen Milchproben wurden mit Enterotoxin B (Makor) versetzt, so daß sich Endkonzentrationen von 10 - 0,5 mcg/ml ergaben. Anschließend wurden diese Proben mit 3 n HCl auf pH 4,0 eingestellt (STOJANOW und SCHENK, 1966, 1970) und erhitzt (siehe 3.1.2.). Die Milchpulver wurden zuerst der Vorschrift des INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBANDES (1970) entsprechend rekonstituiert und dann in gleicher Weise behandelt wie die Konsummilchproben. Allerdings beliefen sich deren Enterotoxin-Endkonzentrationen wie auch die bei den Hackfleischproben auf 200 bzw. 144 mcg Enterotoxin B (Makor)/ml Milch bzw. Extrakt.

In zwei Versuchsreihen wurden der rekonstituierten Milch und dem Hackfleischextrakt statt Enterotoxin B in Substanz Kulturfiltrate von Staph. aureus-Stamm 243 (ATCC 14458) bzw. Stamm S 6 (ATCC 13566) zugegeben, so daß die Milch bzw. der Hackfleischextrakt 180 mcg Enterotoxin B/ml aufwiesen. (Enterotoxin A wurde von dem institutseigenen Stamm S 6 nicht mehr produziert.)

Der weitere Untersuchungsgang erfolgte sowohl bei allen mit Enterotoxin versetzten Proben als auch den stets parallel zur Kontrolle mitlaufenden Proben ohne Enterotoxinzugabe in der bereits beschriebenen Art und Weise (siehe 3.1.2.).

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Froschspermatest (FST)

3.2.1.1. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Enterotoxin A bzw. B

Bei den Versuchen, unterschiedliche Konzentrationen von in 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 6,8, gelöstem Enterotoxin B (Makor) mit Hilfe des FST nachweisen zu können, ergaben sich die in Tab. 1 wiedergegebenen Werte. Danach war z.B. bei der höchsten Enterotoxin-konzentration von 7,2 mg/ml die Spermbewegung bereits durchschnittlich nach 7 Sek. erloschen, während bei einer Konzentration von 112,5 mcg/ml dazu im Mittel 512 Sek. notwendig waren. Der bei der Enterotoxinkonzentration von 28 mcg/ml registrierte Mittelwert unterschied sich mit 607 Sek. noch signifikant ($p < 0,01$) von dem der enterotoxinfreien Kontrolle (620 Sek.); die Einzelwerte dieser beiden Gruppen ließen sich - wie auch an den Extremwerten zu ersehen ist - jedoch nicht immer voneinander abgrenzen. Die zwischen Enterotoxingehalt der Probe und Beweglichkeitsdauer der Spermien bestehende Beziehung ist sehr eng ($r = -0,99$) und konnte statistisch abgesichert werden ($p < 0,001$). Von der Voraussetzung ausgehend, daß zwischen den beiden erwähnten Merkmalen eine lineare Beziehung besteht, wurde die Lage der Regressionsgeraden berechnet. Diese (Abb. 2) hat die Gleichung $y = 714,5 - 78,3 \cdot x$, wobei y die mittlere Beweglichkeitsdauer der Spermien (Sek.) angibt, die bei einer beliebigen Enterotoxinkonzentration x zu erwarten ist. (Für diese Berechnung wurden nicht die Enterotoxinkonzentrationen mcg/ml berücksichtigt, sondern aufgrund der im Rahmen der Versuche stets verdoppelten Enterotoxinkonzentrationen die Werte 1 (28 mcg) bis 9 (7200 mcg) eingesetzt.

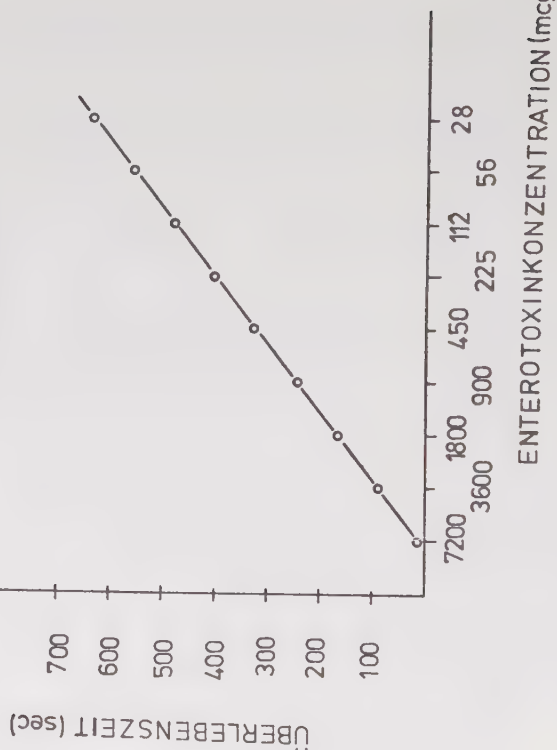
Bei den später durchgeführten ergänzenden Versuchen mit geringeren Konzentrationen dieses Enterotoxins (15 bzw. 10 mcg/ml) zeigte sich, daß keine eindeutigen - statistisch abzusichernden - Einflüsse mehr

Tabelle 1: Beweglichkeitsverlust von Froschspermien durch Einwirkung von Enterotoxin
in Abhängigkeit von dessen Konzentration

Enterotoxintyp	Konzentration (mcg/ml)	Anzahl der Versuche	Zeitspanne bis zum Aufhören der Spermienbeweglichkeit (in Sek.)		
			$\bar{X}$	V %	Extremwerte
B (Makor)	7200	50	7	37,5	3 - 12
	3600	50	116	8,3	100 - 130
	1800	50	171	9,3	140 - 200
	900	48	215	5,8	190 - 240
	450	52	304	6,8	250 - 330
	225	52	382	3,6	350 - 400
	112,5	50	512	3,9	480 - 570
	56	20	602	3,3	570 - 640
	28	19	607	3,6	580 - 650
	0	50	620	2,5	580 - 650
B (Serva)	25	20	600	2,4	580 - 640
B - III	1000	15	270	5,4	240 - 290
	2000	15	210	5,8	180 - 220
	4000	15	50	30,2	30 - 70
A	1000	20	300	4,2	280 - 330
	2000	20	240	7,4	200 - 250
	0	20	620	2,3	590 - 640

Abb. 2

Regressionsgrade zur Bestimmung der Enterotoxinkonzentration an Hand der Überlebenszeit von Froschspermien



Gantze, Klaus

Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen
in Lebensmitteln mittels Froschspermatest und
dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.
1976. 2 Bl., 99 S., 2 Bl. 8^o

München, Univ., Fachber. Tiermed., Diss. 1976.



Gantze, Klaus

Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen
in Lebensmitteln mittels Froschspermatest und
dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.
1976. 2 Bl., 99 S., 2 Bl. 8^o

München, Univ., Fachber. Tiermed., Diss. 1976.



3.2.1.2. Verhalten der Froschspermien gegenüber verschiedenen Enterotoxinlösungs- und Extraktionsmitteln

Verschiedene zur Auflösung und Verdünnung von Enterotoxin dienende Flüssigkeiten erwiesen sich im Gegensatz zum Dinatriumhydrogenphosphat als spermizid (Tab. 3). Besonders stark war dieser Einfluß bei autosterilem Lösungsmittel (Bayer), physiologischer Kochsalzlösung sowie Aqua bidest., während die von der 0,37%igen Hirn-Herz-Bouillon ausgehenden toxischen Effekte relativ gering waren. Aus der Eichkurve für Enterotoxin B (Abb. 2) läßt sich abschätzen, daß durch die erwähnten Lösungsmittel durchschnittliche Enterotoxinkonzentrationen von ca. 100 mcg/ml (Hirn-Herz-Bouillon) bis ca. 6500 mcg/ml (autosteriles Lösungsmittel) vorgetäuscht wurden.

Auch bei der Extraktion und Isolierung von Enterotoxin aus Lebensmitteln zur Anwendung kommende Reagenzien können falsch-positive Resultate im FST bewirken (Tab. 3), sofern sie noch in der zu untersuchenden Probe vorhanden sind. Dies gilt selbst für das im Rahmen der "präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln" (STOJANOW und SCHENK, 1966, 1970) eingesetzte Esbach'sche Reagenz, das in 0,02%iger Konzentration im Mittel innerhalb von 100 Sek. dazu führte, daß die Spermien nicht mehr beweglich waren und damit der Wirkung von ca. 3200 mcg Enterotoxin entsprach. Bei der 0,1% Trypsinlösung (REISER et al., 1974) war der spermizide Effekt nicht so ausgeprägt, bei Chloroform dagegen noch stärker.

Tabelle 3: Beweglichkeitsverlust von Froschspermien durch Einwirkung von verschiedenen Lösungs- und Extraktionsmitteln

Medium	Mittlere Zeitspanne (Sek.) bis zum Aufhören der Spermienbeweglichkeit*)	Enterotoxinäquivalente (in mcg/ml)
Aqua bidest.	120	ca. 3000
physiol. NaCl	50	ca. 5400
autosteril. Lösungsmittel	30	ca. 6500
Hirn-Herz-Bouillon	550	ca. 100
Na_2HPO_4	620	-
Trypsin (0,1%)	150	ca. 2000
Esbach's Reagenz (0,02%)	100	ca. 3200
Chloroform	10	ca. 7000
Na_2HPO_4	620	-

*) Mittelwert aus je 20 Versuchen

3.2.1.3. Verhalten der Froschspermien gegenüber sonstigen bakteriellen Stoffwechselprodukten

Die Versuche mit Endotoxin (*E. coli* 055 : 85 (Difco)) sowie Staphylokokken-Hämolysinen zeigten ebenfalls, daß Froschspermien nicht nur auf Enterotoxine reagieren. So wirkten z.B. 1 mcg Coli-Endotoxin bzw. 1 Einheit α -Hämolysin (Behringwerke) wie ca. 450 - 500 mcg Enterotoxin, jeweils bezogen auf 1 ml (Tab. 4). α -Hämolysin war nach Neutralisation mit Anti-Staphylolysin-Serum (Behringwerke) noch spermizider als vor der Anti-Staphylolysin-Serum-Zugabe. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Beweglichkeit der Froschspermien bereits durch das zur Kontrolle mitlaufende Anti-Serum allein sehr stark eingeschränkt wurde. Auch das selbst hergestellte β -Hämolysin eines nichtenterotoxinogenen *Staphylococcus aureus*-Stammes erbrachte falsch-positive Resultate im FST. Bei den beiden Kontrollen (Enterotoxin bzw. Puffer) wurden zu erwartende Ergebnisse registriert (Tab. 4).

3.2.2. Isolierung und Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin

3.2.2.1. Erhitzen

Zur Ermittlung eines möglichen Einflusses der Hitzebehandlung auf die serologische bzw. biologische Aktivität von Enterotoxin B wurde am Lehrstuhl hergestelltes bzw. von der Firma Makor bezogenes Enterotoxin in 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer bzw. in gepufferten Wurstextrakten gelöst und im Wasserbad für 30 Min. auf 85°C bzw. 100°C erhitzt.

Insgesamt spiegelt der erste Teil von Tabelle 5 das Ergebnis von jeweils 10 Versuchen mit den beiden Enterotoxinprodukten wider. Danach nahm die serologische Aktivität des im Puffer gelösten Makor-Produktes (900 mcg/ml) - gemessen im Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN (1952) bzw. MANCINI et al. (1965) - nach Erhitzung auf 85°C stärker ab, als

Tabelle 4: Beweglichkeitsverlust von FrochspERMien durch Einwirkung
verschiedener sonstiger Bakterienstoffwechselprodukte

Toxin	Zahl der Versuche	Konzentration	mittlere Zeitspanne bis zum Aufhören der SpERMien- beweglichkeit	Enterotoxinäquivalente (mcg/ml)
Endotoxin (E. coli 055:85)	30	1 mcg/ml	300	ca. 450
	30	5 mcg/ml	185	ca. 1700
	30	10 mcg/ml	120	ca. 3000
α -Hämolyisin (Behringwerke)	10	1 U/ml	290	ca. 500
	10	5 U/ml	150	ca. 2000
neutralisiertes α -Hämolyisin	10	1 U/ml	180	ca. 1700
	10	5 U/ml	120	ca. 3000
B-Hämolyisin	20	1:2	15	ca. 7000
	20	1:4	20	ca. 7000
	20	1:8	35	ca. 6500
	20	1:16	180	ca. 1700
Anti- α -Staphylo- lysin-Serum	15	-	30	ca. 6500
Kontrolle (Na ₂ HPO ₄)	10	-	620	-
Kontrolle (Enterotoxin B/Makor)	20	900 mcg/ml	220	ca. 900

nach Erhitzung auf 100°C. Diese Tatsache konnte in den Objektträger-Gel-Diffusionstests insofern bestätigt werden, als bei der auf 100°C erhitzten Probe noch höhere Verdünnungen positiv reagierten als bei den auf 85°C erhitzten Proben. Die im FST ermittelte biologische Aktivität war nach der Erhitzung auf 85°C um zwei Drittel vermindert, während sie nach der Erhitzung auf 100°C unverändert blieb. Bei dem am Lehrstuhl hergestellten Produkt, das in einer Konzentration von 1000 mcg/ml getestet wurde, nahm die serologische Aktivität infolge Erhitzung etwas stärker ab (80%) als beim Makor-Produkt (ca. 70%). Unterschiede hinsichtlich der Temperaturhöhe konnten jedoch nicht beobachtet werden. Auch die biologische Aktivität war bei diesem Produkt stärker herabgesetzt - mit 85 - 90% sogar stärker als die serologische Aktivität - , allerdings wiederum bei 100°C nicht so sehr wie bei 85°C. Die enterotoxinfreien Kontrollen waren in allen Tests negativ. Bei Verwendung von 100 mcg/ml anstelle von 900 mcg/ml Enterotoxin B (Makor) wurden in der Tendenz gleiche Ergebnisse erzielt; allerdings war die biologische Aktivität auch bei Erhitzung auf 100°C vermindert, und zwar um 50% (Tab. 5).

Bei der Untersuchung von gepuffertem Wurstextrakt ergab sich, daß die serologische Aktivität, die aufgrund der unspezifischen Reaktionen im Oudin-Test nur im Mancini-Test bzw. in den Objektträger-Diffusionstests ermittelt werden konnte, etwas weniger stark beeinflusst wurde, als die des im Puffer gelösten Enterotoxins. Die bei der Durchführung des FST registrierten Werte können nicht berücksichtigt werden, da sie in gleicher Höhe auch in der enterotoxinfreien Kontrolle zu beobachten waren.

Tabelle 5: Erhitzungseinfluß (30 Min. bei 85⁰C bzw. 100⁰C) auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B in Puffer und gepufferten Wurstextrakten

Medium (Enterotoxin)	Durchschnittlicher Enterotoxingehalt in mcg/ml					
	vor Erhitzung (*)		nach Erhitzung (**)		nach Erhitzung (100 ⁰ C)	
	serologisch	biologisch	serologisch	biologisch	serologisch	biologisch
Puffer (B, Makor)	900	900	250	300	300	900
Puffer	0	0	0	0	0	0
Puffer (B, Lehrstuhl)	1000	1000	200	100	200	150
Puffer	0	0	0	0	0	0
Puffer (B, Makor)	100	100	15	40	20	50
Puffer	0	0	0	0	0	0
Wurstextrakt (B, Makor)	100	1900	25	1800	40	1800
Wurstextrakt	0	1800	0	1800	0	1800

*) Einfach-Gel-Diffusionstest (geschätzte Werte)

**) FST (geschätzte Werte)

3.2.2.2. Dialyse und Konzentration

Zur Prüfung des Einflusses von Dialyse und Konzentration wurden - nachdem Versuche mit Dialysierschläuchen erfolglos verlaufen waren - 10 ml Puffer mit 200 mcg Enterotoxin B in trockenes Bio-Gel P-10 eingeleitet. Nach ca. 20minütiger Einwirkung war das Flüssigkeitsvolumen auf ca. 1 ml eingengt, serologisch waren jedoch von den ursprünglichen 200 mcg nur noch 160 - 180 mcg nachweisbar. Die Froschspermien überlebten bei Testung der Ausgangslösung 390 Sek., während diese Frist nach der Konzentrierung 470 Sek. betrug (entspricht ca. 160 mcg). Die Vermutung, daß bei der Konzentrierung eine Bindung von Enterotoxin an das Gel nicht vollständig auszuschließen ist, wurde insofern bestätigt, als aus dem zur Konzentrierung benutzten, zurückbleibenden Gel stets noch geringe Enterotoxinmengen ausgewaschen werden konnten (1 - 5 mcg/ml).

3.2.2.3. Gelfiltration

Die Modellversuche zur Gelfiltration dienten dazu, die geeignete Gelsorte für spätere Versuche mit Lebensmitteln zu finden und einen Anhaltspunkt zu gewinnen, wann mit dem Erscheinen des Enterotoxins im Eluat zu rechnen ist. Als Material standen jeweils 10 ml einer 200 mcg Enterotoxin B/ml enthaltenden Pufferlösung zur Verfügung.

Die Handhabung von Bio-Gel P-60 und Bio-Gel P-100 (Bio-Rad Laboratories, USA) war insofern etwas schwieriger als jene von Sephadex, als die Durchflußgeschwindigkeit von Gelfiltration zu Gelfiltration deutlich abnahm. Die empfohlene Durchflußrate von 5 ml/Min. (STOJANOW und NESTOROW, 1967) konnte nur gehalten werden, wenn die Säule vor Versuchsbeginn stets neu gepackt wurde. Bei Unterschreitung dieser Durchflußgeschwindigkeit wurden die enterotoxinhaltigen Fraktionen nur ungenügend von Fraktionen mit Esbach's Reagenz getrennt. Diese Trennung ist jedoch unbedingt erforderlich, da - wie in 3.2.1.2. bereits beschrieben wurde - durch dieses Reagenz unspezifische Motilitätsverluste

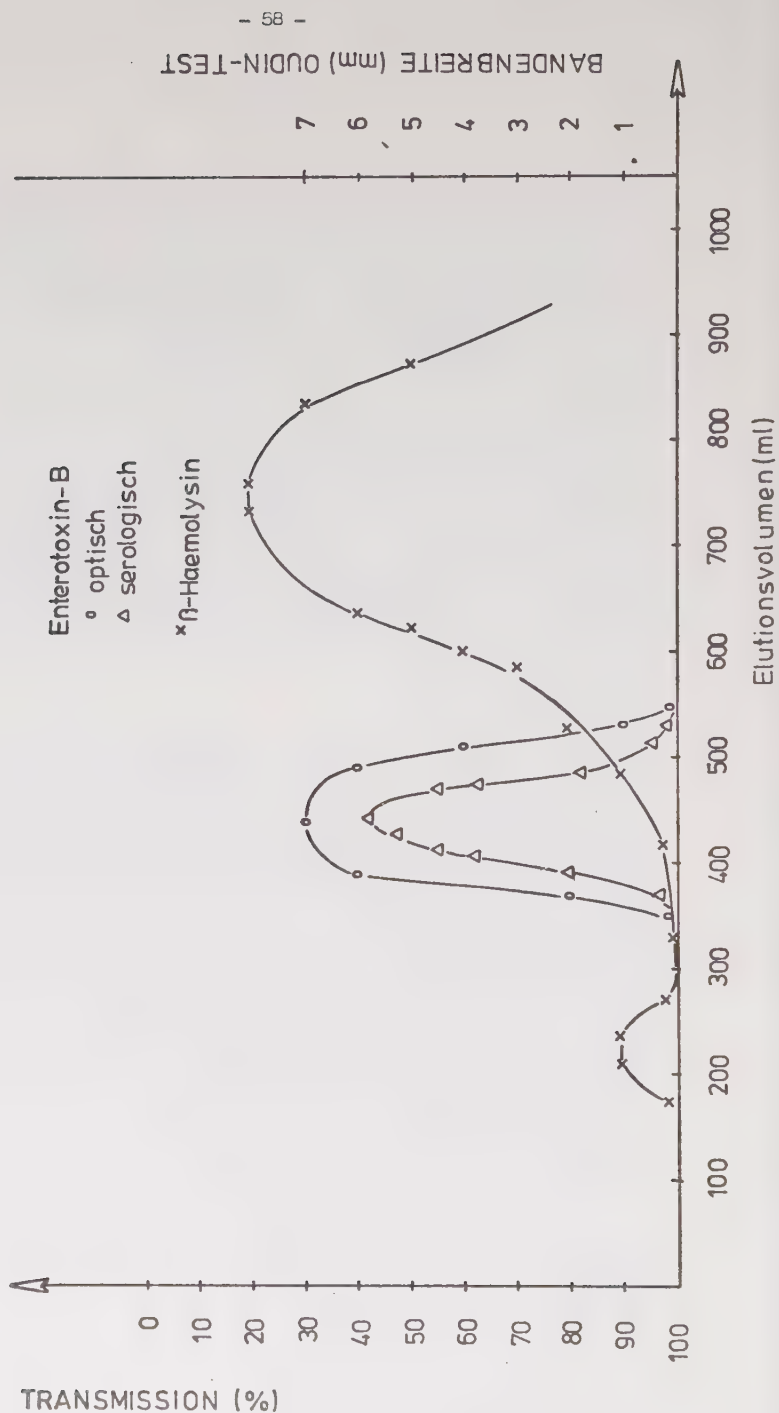
der Froschpermien verursacht werden. Da Sephadex G-75 gegenüber Sephadex G-50 einen für Enterotoxine günstigeren Fraktionierungsbereich besitzt, wurde diesem für die weiteren Untersuchungen der Vorzug gegeben. Im Vergleich mit den beiden Bio-Gel-Produkten war hier eine einwandfreie Trennung der enterotoxinhaltigen Fraktionen von denen, die Esbach's Reagenz enthielten, möglich.

Abb. 3 stellt eine typische Elutionskurve von Enterotoxin B unter Verwendung von Sephadex G-75 als Gel dar. Die Messung der Eluate bei 277 nm ergab bei allen zehn Versuchsreihen verminderte Transmissionen im Bereich von 300 bis 600 ml, wobei die geringste Transmission im Bereich von 425 - 450 ml zu beobachten war. Bei der serologischen Testung der Proben konnten die Ergebnisse der Transmissionsmessungen bestätigt werden (Abb. 3). Bei der Gelfiltration wurde im übrigen stets ein Verlust an Enterotoxin B registriert, der sich auf 10 - 25% der Ausgangskonzentration belief.

Das Elutionsdiagramm des β -Hämolysins eines nichtenterotoxinogenen *Staphylococcus aureus*-Stammes (Abb. 3) unterschied sich zwar insbesondere hinsichtlich der geringsten Transmission bei 277 nm deutlich von dem des Enterotoxins, doch lassen sich gewisse Überschneidungen nicht ausschließen. Die Elution des β -Hämolysins erfolgte im Bereich von ca. 175 ml bis 900 ml. Bei der Testung der Fraktionen stellte sich jedoch heraus, daß diejenigen des Vorpeaks (175 - 300 ml) im Gegensatz zu jenen des Hauptpeaks (ab 450 ml) keine Lysis auf Blutplatten bewirkten. Bei der Gelfiltration der Endotoxine wurde dagegen bei keiner Fraktion (bis 900 ml) eine eindeutige Abnahme der Transmission bei 277 nm beobachtet.

Elutionsdiagramm von Enterotoxin-B und
 β -Haemolysin an Sephadex-G 75

Abb. 3



3.2.2.4. Wiedergewinnungsrate

Für die Untersuchungen zur Ermittlung der Wiedergewinnungsrate wurden zuerst rekonstituierte Trockenmagermilchproben (jeweils 10 ml) eingesetzt, in denen Enterotoxin B weder serologisch (Einfach-Gel-Diffusionstests nach OUDIN (1952) bzw. MANCINI et al. (1965) sowie Objektträger-Gel-Diffusionstests (CASMAN, 1967; SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) noch biologisch (Froschspermatetest nach KRÜGER, STOJANOW und MEESER, 1965) nachweisbar waren. Die nach Zusatz definierter Enterotoxinmengen erzielten Ergebnisse und die daraus abgeschätzten Wiedergewinnungsraten sind in der Tab. 6 wiedergegeben. Danach ergab sich bei den Proben I - IV, denen jeweils 1440 mcg Enterotoxin B (Makor) zugesetzt worden waren, eine Wiedergewinnungsrate von rund 60%, bei den Proben V - VIII mit Zusatz von 2000 mcg Enterotoxin B eine solche von 75% (serologischer Nachweis) bzw. 65 - 75% (biologischer Nachweis). Demgegenüber bestanden bei den beiden Proben IX und X, denen insgesamt 1800 mcg Roh toxin aus Kulturfiltraten (Hirn-Herz-Bouillon) von Staphylococcus aureus 243 bzw. S 6 zugesetzt worden waren, deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen der serologischen und des biologischen Tests. Serologisch wurden nur zwei Drittel des zugegebenen Enterotoxins wiedergefunden, während aufgrund der im FST beobachteten Überlebensdauer der Spermien davon ausgegangen werden mußte, daß das zugesetzte Enterotoxin nahezu vollständig wieder nachzuweisen war. Bei den gleichen Milchpulverproben (IXa bzw. Xa) wurden im FST jedoch auch positive Ergebnisse registriert, wenn ihnen nur sterile, unbeimpfte Hirn-Herz-Bouillon zugesetzt worden war. Die hierdurch vorgetäuschten Enterotoxinmengen beliefen sich auf ca. 75 - 100 mcg. Die erwähnten serologischen Tests verliefen bei den enterotoxinfreien, sterile Hirn-Herz-Bouillon enthaltenden Proben IXa und Xa stets negativ, nur der zusätzlich durchgeführte Ringpräzipitationstest nach SIROTININA (1962) war ebenfalls positiv.

Bei den Rinderhackfleischproben (Tab. 7) fiel auf, daß der FST bereits positiv reagierte, bevor Enterotoxin zugesetzt worden war. Während

Tabelle 6: Wiedergewinnung von Enterotoxin B aus rekonstituierter Trockenmilch mit definiertem Enterotoxinzusatz

Probe	Enterotoxin (mcg) zugesetzt	nachgewiesen *)		Wiedergewinnungsrate (%) serologisch	biologisch	Ringpräzipitationstest
		serologisch	biologisch			
I	1440	850	800	59	56	positiv
II	1440	850	840	59	58	"
III	1440	850	840	59	58	"
IV	1440	850	800	59	56	"
V	2000	1500	1300	75	65	"
VI	2000	1500	1500	75	75	"
VII	2000	1500	1500	75	75	"
VIII	2000	1500	1300	75	65	"
IX	1800 **)	1200	1800	67	100	"
X	1800 **)	1200	1600	67	89	"
IXa	0 ***)	0	100	./.	./.	"
Xa	0 ***)	0	75	./.	./.	"

*) Geschätzte Werte (Einfach-Gel-Diffusionstest bzw. FST)

**) Rohtoxin (Hirn-Herz-Bouillon-Kulturfiltrat)

***) sterile Hirn-Herz-Bouillon

Tabelle 7: Wiedergewinnung von Enterotoxin B aus Rinderhackfleischextrakten mit definiertem Enterotoxinzusatz

Probe	zugesetzt	Enterotoxin (mcg) nachgewiesen*)		Wiedergewinnungsrate (%) serologisch	Wiedergewinnungsrate (%) biologisch	Ringpräzipitationstest
		serologisch	biologisch			
XI	1440	750	950	52	66	positiv
XI	0	0	60			negativ
XII	1440	750	900	52	63	positiv
XII	0	0	60			"
XIII	2000	1200	1500	60	75	"
XIII	0	0	60			negativ
XIV	2000	1200	1400	60	70	positiv
XIV	0	0	60			"
XV	2000	1200	1500	60	75	"
XV	0	0	60			"
XVI	1800**)	1000	1150	56	64	"
XVI	0	0	60			"
XVI	0***)	0	160			"

*) Geschätzte Werte (Einfach-Gel-Diffusionstest bzw. FST)

**) Roh toxin (Hirn-Herz-Kulturfiltrat)

***) sterile Hirn-Herz-Bouillon

auch im Ringpräzipitationstest nach SIROTININA (1962) vier Proben positiv waren, erbrachten die Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN (1952) bzw. MANCINI et al. (1965) wie auch die Objektträger-Gel-Diffusionstests bei diesen Proben stets negative Resultate. Die serologisch ermittelte Wiedergewinnungsrate war bei der geringeren Enterotoxinkonzentration (1440 mcg) mit 52% wiederum etwas niedriger als jene bei Zusatz von 2000 mcg (60%). Die gleiche Tendenz war bei Durchführung des FST zu beobachten. Allerdings lagen die Werte - vermutlich aufgrund der falsch-positiven Resultate bei den enterotoxinfreien Ausgangsproben - jeweils etwas höher als beim serologischen Nachweis. Beim Zusatz von Rohtoxin war die "Wiedergewinnungsrate" bei Berücksichtigung des Ergebnisses des FST (64%) bei weitem nicht so hoch wie bei den rekonstituierten Trockenmilchproben (89 bzw. 100%); bei den serologisch ermittelten Wiedergewinnungsraten war dieser Unterschied (67% gegenüber 56%) erheblich geringer.

Abschließend wurden einige Konsummilchproben (10 ml) mit Enterotoxin B (Makor) in Mengen von 10; 5; 2,5; 1 bzw. 0,5 mcg/ml versetzt, um feststellen zu können, ob und inwieweit Enterotoxin in diesen Konzentrationen nach der "präparativen Isolierung" (STOJANOW und SCHENK, 1966) noch nachweisbar ist. Aus Tab. 8 geht hervor, daß der serologische Nachweis nur bei Zusatz von insgesamt 100, 50 bzw. 25 mcg Enterotoxin pro Probe positiv verlief, bei Anwendung des FST jedoch selbst bei 100 mcg keine Hinweise auf die Anwesenheit von Enterotoxinen zu beobachten waren. Die Proben mit 10 bzw. 5 mcg Enterotoxin waren auch in den Einfach-Gel-Diffusionstests bzw. Objektträger-Gel-Diffusionstests (mit einer Empfindlichkeit von 0,5 mcg Enterotoxin/ml) negativ. Die Wiedergewinnungsraten lagen mit nur ca. 4 - 5% deutlich niedriger als jene bei den hohen Enterotoxinmengen (1440 bzw. 2000 mcg) in den rekonstituierten Trockenmagermilchproben bzw. Rinderhackfleischproben. Offensichtliche Unterschiede zwischen pasteurisierter (Proben XVII bis XXVI) und ultrahocherhitzter Konsummilch (Proben XXVII bis XXXI) waren nicht zu registrieren.

Tabelle 8: Wiedergewinnung von Enterotoxin B aus Konsummilch mit definiertem Enterotoxinzusatz

Probe (Konsummilch)	zugewiesen *)	Enterotoxin (mcg)	
		serologisch	biologisch
XVII past.	100	4,2	-
XVIII "	50	2,6	-
IXX "	25	1,5	-
XX "	10	-	-
XXI "	5	-	-
Kontrolle	0	-	-
XXII past.	100	3,6	-
XXIII "	50	2,0	-
XXIV "	25	-	-
XXV "	10	-	-
XXVI "	5	-	-
Kontrolle past.	0	-	-
XXVII ultrahochermittelt	100	4,5	-
XXVIII "	50	3,0	-
IXX "	25	1,7	-
XX "	10	-	-
XXI "	5	-	-
Kontrolle "	0	-	-

*) Geschätzte Werte (Einfach-Gel-Diffusionstest bzw. FST)

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Tatsache, daß Staphylokokken-Enterotoxine Proteine sind, schließt chemische Nachweisverfahren bei der Untersuchung von Lebensmitteln, die häufig einen hohen Eiweißanteil aufweisen, weitgehend aus, da es keine Methoden gibt, die für ein bestimmtes Protein allein spezifisch sind. Theoretisch wäre es zwar möglich, in gleicher Weise wie bei der Vorbereitung zur immunologischen Untersuchung Enterotoxine unter Anwendung chromatographischer Verfahren zu extrahieren und zu reinigen, um sie dann, z.B. mit der Disk-Elektrophorese, nachzuweisen, doch sind dafür die in Lebensmitteln vorhandenen Toxinkonzentrationen zu gering. Das anzuwendende Verfahren muß daher sehr empfindlich sein, eine Voraussetzung, die nur bei Ausnutzung der biologischen Aktivität oder der immunogenen Eigenschaften des Enterotoxins gegeben ist. Die bekanntesten biologischen Methoden (Affenfütterungstest, Kätzchentest) beruhen auf der emetischen Wirkung der Enterotoxine, doch wurde - wie aus dem Literaturteil dieser Arbeit ersichtlich wird - auch wiederholt versucht, Enterotoxine aufgrund anderer biologischer Effekte nachzuweisen. Zu diesen Verfahren gehört u.a. der von KRÜGER, STOJANOW und MEESER (1965 und 1968) entwickelte Froschspermatest (FST), der in der Bundesrepublik - soweit bekannt - in der Routine nur in einem Institut (kommerziell) durchgeführt wird. Bei diesem Test wird davon ausgegangen, daß Enterotoxin als Neuroparalytikum auf die Froschspermien wirkt (STOJANOW, 1964; MÜLLER, 1969a; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972) und der toxische Effekt sich entsprechend der Konzentration des Enterotoxins in der Abnahme der Spermienbeweglichkeit ausdrückt. Da über die Eignung des FST wie auch des Verfahrens der "präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln" (STOJANOW und SCHENK, 1966 und 1970; STOJANOW und NESTOROW, 1967; MEESER und STOJANOW, 1968) bisher nur Angaben von den Erfindern bzw. vom deutschen Lizenznehmer (MÜLLER, 1969; MÜLLER und STOJANOW, 1971; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972), nicht aber von anderen Untersuchern bekannt sind, sollte geprüft werden, ob die Anwesenheit von Enterotoxin in Lebensmitteln (auch

in geringen Konzentrationen) innerhalb eines Tages mit ausreichender Sicherheit festgestellt und unspezifische Reaktionen weitestgehend ausgeschaltet werden können.

Im ersten Teil der Versuche wurde die Praktikabilität, Sensitivität und Spezifität des zum quantitativen Enterotoxinnachweis (KRÜGER, STOJANOW und MEESER, 1965 und 1968; MEESER und STOJANOW, 1968) empfohlenen FST bestimmt. Bei der Gewinnung des Spermas ergaben sich zunächst insofern Schwierigkeiten, als nach Verabfolgung von 5 - 10 i.E. Prolan A - in Anlehnung an die Angaben oben zitierter Autoren - ca. 2 bis 2,5 Stunden vergingen, bevor Spermien gewonnen werden konnten. Zudem war häufig nicht nur die Anzahl der Spermien insgesamt, sondern auch der Anteil der beweglichen Spermien weitaus niedriger als 90 - 95% (KRÜGER, STOJANOW und MEESER, 1965). Erst bei höherer Dosierung des Hypophysenvorderlappenhormons (50 i.E.) gelang es, innerhalb von einer Stunde Ejakulat mit dem gewünschten Prozentsatz beweglicher Spermien zu erhalten. Sofern das ca. 2 - 3 ml betragende Ejakulat anschließend in seiner Gesamtheit belassen wurde, blieben Spermien bis zu 20 Minuten beweglich. Wurde das Sperma jedoch in die für den Test erforderlichen Mengen zu 0,02 ml aufgeteilt, war die Beweglichkeit der Spermien spätestens nach 12 Minuten erloschen. (Da sich diese Versuche, von kurzen Unterbrechungen abgesehen, über mehr als ein Jahr erstreckten, konnte ein jahreszeitlicher Einfluß, wie er z.B. von EDDY (1951) für die unterschiedliche Auslösung von Spasmen bei Fröschen nach Enterotoxineinwirkung diskutiert wird, ausgeschlossen werden.) Infolgedessen war auch eine sich über diesen Zeitpunkt hinaus erstreckende Beobachtung der Spermien - nach KRÜGER, STOJANOW und MEESER (1965 und 1968) sowie STOJANOW und NESTOROW (1967) bis 20 Minuten - im Hinblick auf eine Abnahme ihrer Beweglichkeit nach Zugabe der zu testenden Probe unnötig.

Die Untersuchungen zur Ermittlung der Sensitivität des FST zeigten, daß Enterotoxin B in Konzentrationen von ca. 100 mcg/ml 0,02 m Dinatriumhydrogenphosphatpuffer mit Sicherheit nachgewiesen werden kann, da die

Beweglichkeitsdauer (maximal 570 Sek.) stets unter der der enterotoxin-freien Kontrolle (minimal 580 Sek.) lag. Bei Konzentrationen von 56 bzw. 28 mcg/ml (Makor) sowie 25 mcg/ml (Serva) wurden zwar vereinzelt Zeiten registriert, die nur für die enterotoxinfreie Kontrolle zu erwarten gewesen waren. Die statistische Verrechnung aller Ergebnisse erbrachte bei diesen Konzentrationen, daß sich die Mittelwerte der enterotoxinhaltigen Proben signifikant ($p < 0,01$) von jenen der Kontrolle unterschieden. Im Gegensatz dazu wichen die Mittelwerte bei 15 bzw. 10 mcg/ml (Makor) nicht mehr signifikant von jenen der Kontrolle ab, so daß anzunehmen ist, daß die Unterschiede zufallsbedingt waren. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, daß die Nachweisgrenze bei den verwendeten handelsüblichen Enterotoxinen zwischen ca. 20 und 30 mcg/ml lag, wobei allerdings nicht auszuschließen ist, daß vereinzelt auch Proben mit Enterotoxingehalten bis zu ca. 100 mcg/ml infolge einer relativ langen Beweglichkeitsdauer der Spermien fälschlicherweise als negativ beurteilt werden. Von dem zur Verfügung stehenden Schrifttum enthielt nur die Publikation von STOJANOW und NESTOROW (1967) einige Angaben zur Sensitivität. Danach brachten 10 mcg/ml 98% reinen Enterotoxins die Bewegung der Froschspermien in 1200 Sekunden (20 Minuten) zum Stillstand, während 320 mcg/ml diesen Effekt augenblicklich auslösten (Abb. 1). Die Ergebnisse unterscheiden sich somit ganz erheblich von den eigenen (10 mcg/ml konnten - wie bereits erwähnt - nicht mehr mit Sicherheit nachgewiesen werden, bei 320 mcg/ml waren die Spermien noch ca. 350 Sek. beweglich), ohne daß, soweit das aus den genannten Arbeiten bzw. Patenten ersichtlich ist, methodische Unterschiede vorgelegen haben.

Die Untersuchungsergebnisse mit den beiden Enterotoxintypen A und B deuten im übrigen an, daß möglicherweise Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Enterotoxintypen gegenüber Froschspermien bestehen. Auch der Mensch scheint bei oraler Applikation dieser beiden Enterotoxine unterschiedlich zu reagieren, allerdings - im Gegensatz zu den Froschspermien - stärker auf Enterotoxin A als Enterotoxin B (RAJ und

BERGDOLL, 1969; BERGDOLL, 1970; DANGERFIELD, 1973), während derartige Unterschiede bei Affen offensichtlich bisher nicht registriert wurden (BERGDOLL et al., 1973). Bei der Bewertung der eigenen Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, daß das verwendete Enterotoxin A von etwas geringerer Reinheit war als das Enterotoxin B und daher aufgrund der im Rahmen anderer Untersuchungen gewonnenen Erfahrungen nicht mit Sicherheit auszuschließen ist, daß nicht auch einige der in diesem Produkt noch vorhandenen Begleitstoffe spermizid waren.

Erste Hinweise für nichtenterotoxinspezifische Reaktionen des FST ergaben sich bei der Testung eines zu anderen Versuchszwecken in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Enterotoxinpräparates, da die Zeitspanne bis zum Beweglichkeitsverlust der Spermien erheblich kürzer war, als aufgrund der Versuche mit in Dinatriumhydrogenphosphatpuffer gelöstem Enterotoxin zu erwarten gewesen war. Bei daraufhin durchgeführten Kontrolluntersuchungen mit verschiedenen zur Lösung von Enterotoxin beschriebenen Flüssigkeiten (physiologische Kochsalzlösung, Aqua dest., Hirn-Herz-Bouillon) war dann stets eine unspezifische spermizide Wirkung zu registrieren, deren Grad abhängig war von der Art des Lösungsmittels. Offensichtlich kann der FST daher nur mit in Dinatriumhydrogenphosphatpuffer gelöstem Material durchgeführt werden. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß der FST auch durch andere Reagenzien (Chloroform, Trypsin, Esbach's Reagenz) und nichtenterotoxinartige bakterielle Stoffwechselprodukte, wie z.B. α - und β -Hämolysine von Staphylokokken, beeinflußt wird. Dies überrascht bei den Hämolysinen jedoch insofern nicht sehr, als STOJANOW (1964) bereits ganz allgemein andeutete, daß wiederholt eine hemmende Wirkung von bakteriellen Abbauprodukten auf den Stoffwechsel von Spermien beobachtet worden sei. ROLLE und KALICH (1954) hatten außerdem berichtet, daß toxische Coli-keime Spermazellen agglutinieren und sich dabei anfangs zuckende Bewegungen der Spermien feststellen lassen, die später völlig aufhören. Untersuchungen, die im Hinblick auf diese Mitteilung und Angaben, daß Coli-Endotoxine biologisch ähnlich wie Enterotoxine wirken können

(CLARK und BORISON, 1963; MARTIN und MARCUS, 1964; SUGIYAMA, McKISSIC und HAYAMA, 1964; SUGIYAMA, 1966; HODOVAL et al., 1967; PEAVY, ADLER und SMITH, 1970; CRAIG et al., 1971; BRUNSON und WATSON, 1974 u.a.), mit Endotoxin von *E. coli* durchgeführt wurden, erbrachten ebenfalls falschpositive Resultate im FST.

Aus den vorliegenden Daten kann somit gefolgert werden, daß der FST nur dann sinnvoll zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin eingesetzt werden kann, wenn unspezifische Reaktionen weitestgehend auszuschließen sind und die Enterotoxinkonzentrationen mehr als 20 mcg/ml betragen. Dies ist z.B. bei gereinigten Enterotoxinpräparaten der Fall. Bei der Untersuchung von Lebensmitteln sind jedoch dem FST verschiedene Extraktions- und Reinigungsschritte (STOJANOW und SCHENK, 1966 und 1970) vorzuschalten. Von diesen dürfte der Gelfiltration, der vor der Untersuchung der Probe im FST nur noch die Rekonzentrierung der enterotoxinhaltigen Fraktionen folgt, besondere Bedeutung zukommen. Sephadex erwies sich für diese Zwecke als besser geeignet als das von STOJANOW und SCHENK (1970) alternativ vorgeschlagene Bio-Gel. Da Sephadex G-75 einen für Enterotoxine günstigeren Molekulargewichtsbereich (Fraktionierbereich) besitzt als Sephadex G-50 (3.000 bis 70.000 gegenüber 1.500 bis 30.000), wurde der erstgenannten Sorte der Vorzug gegeben. Die Modellversuche zeigten jedoch, daß die Gelfiltration keine vollständige Trennung von Staphylokokken-Enterotoxin und Staphylokokken- β -Hämolysin (siehe Abb. 3) erlaubt, auch wenn die bei 277 nm (SCHANTZ et al., 1965) gemessenen Hauptpeaks der beiden Produkte verschiedenen Fraktionen zuzuordnen waren. Dies war aufgrund der Molekulargewichte von Enterotoxin, das nach BERGDOLL et al. (1973) in Abhängigkeit vom Typ zwischen 28.366 und 34.700 liegt, und β -Hämolysin - nach MÖLLBY und WADSTRÖM (1973) im Bereich von 18.000 bis 33.000 - auch zu erwarten gewesen. Infolgedessen sind durch β -Hämolysin bedingte falschpositive Reaktionen im FST selbst nach Gelfiltration nicht mit Sicherheit auszuschließen, auch wenn die dafür erforderlichen Mengen an β -Hämolysin in Lebensmitteln nur in Ausnahmefällen vorhanden sein dürften. Das α -Hämolysin dürfte trotz eines ähnlichen Molekulargewichtes (ARBUTHNOTT, FREER und McNIVEN, 1973) den Enterotoxinnachweis

mit dem FST nach Durchführung des vorgeschriebenen Extraktionsverfahrens kaum mehr stören, da es aufgrund seiner geringeren Hitzestabilität (SEELEMANN und OBIGER, 1956) bereits bei der Erhitzung des Lebensmittel-Pufferextraktes weitestgehend inaktiviert wird. Endotoxine gramnegativer Keime beeinträchtigen den FST nach Gelfiltration mit Sicherheit nicht mehr, da sie aufgrund ihres sehr viel höheren Molekulargewichtes (LÜDERITZ et al., 1971) eher als Enterotoxin im Eluat erscheinen, ohne dabei die für Enterotoxin typische Abnahme der Transmission bei 277 nm zu bewirken. Im Gegensatz dazu enthielten mit Hirn-Herz-Bouillon versetzte Milchproben wie auch Rinderhackfleischproben noch nach Durchführung des von STOJANOW und SCHENK (1966 und 1970) vorgeschriebenen Extraktionsverfahrens Substanzen, die den FST beeinflussen. Bei den Milchproben waren vermutlich Bestandteile der spermiziden Hirn-Herz-Bouillon für die falschpositiven Ergebnisse verantwortlich. Es blieb jedoch unklar, weshalb die Beweglichkeit der Froschspermien auch bei enterotoxinfreien Rinderhackfleischproben deutlich herabgesetzt war, zumal STOJANOW und NESTOROW (1967) sowie SCHMIDT, WEIS und WEVER (1972) derartige Reaktionen nicht beschrieben haben. Bemerkenswert war, daß die im FST falschpositiv reagierenden Hackfleischproben zum Teil auch im Ringpräzipitationstest nach SIROTININA (1962) positiv waren.

Für die Beurteilung der Eignung des Extraktionsverfahrens ist auch von Bedeutung, ab welchen Enterotoxinkonzentrationen der im Anschluß zu führende FST noch positiv ausfällt. Nach STOJANOW und NESTOROW (1967), MÜLLER (1969 b) sowie SCHMIDT, WEIS und WEVER (1972) sollen zwar Enterotoxinmengen von weniger als 1 mcg/g Lebensmittel sicher nachweisbar sein, doch konnte dies bei den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Der FST reagierte nämlich bereits bei 10 mcg/g nicht mehr positiv, während der Objektträger-Gel-Diffusionstest (CASMAN, 1967; SOMMERFELD und TERPLAN, 1975), der sich bei vorhergehenden Vergleichsuntersuchungen mit Enterotoxinpräparaten als erheblich sensativer erwiesen hatte, immerhin noch bei 2,5 mcg/g positiv ausfiel. Damit ist das Untersuchungsverfahren - unabhängig von der Art des eigentlichen Enterotoxinnachweises -

sehr viel weniger empfindlich als die anderen in Übersicht 2 genannten Verfahren. Da Enterotoxikosen beim Menschen bereits bei Aufnahme von 1 mcg Enterotoxin A beobachtet wurden (BERGDOLL, 1970) und DANGERFIELD (1973) die mittlere krankmachende Dosis für den Menschen (70 kg) mit 10 mcg angibt, ist das Verfahren nicht geeignet, um bei negativen Befunden Staphylokokkenintoxikationen mit Sicherheit ausschließen zu können. Dies scheint nur dann möglich zu sein, wenn - wie REISER et al. (1974) fordern - Verfahren zum Einsatz kommen, mit denen noch Enterotoxinmengen von 0,125 bis 0,25 mcg pro 100 g Lebensmittel nachweisbar sind.

Bei Enterotoxinkonzentrationen von mehr als 100 mcg/g Lebensmittel betrug die Wiedergewinnungsrate zwischen 60 und 75%. Während MEESER und STOJANOW (1968) bei Milchproben mit dem FST ebenfalls 60 - 75% der zugesetzten Enterotoxinmengen erfaßten, hatten STOJANOW und NESTOROW (1967) mit 92,4% bei Gehacktem eine noch höhere Wiedergewinnungsrate registriert. In Modellversuchen konnte festgestellt werden, daß bei der Erhitzung des Lebensmittel-Pufferextraktes, bei der insgesamt zweimal durchgeführten Dialyse und Konzentration wie auch bei der Gelfiltration nicht unerhebliche Enterotoxinverluste zu verzeichnen sind. Von diesen Schritten dürfte der Erhitzung für 30 - 60 Min. bei 80 - 100°C (STOJANOW und SCHENK, 1966) bzw. 30 Min. bei 85°C (STOJANOW und NESTOROW, 1967; STOJANOW und SCHENK, 1970) die größte Bedeutung zukommen. Der Grad des Enterotoxinverlustes ist zwar - wie aus der Literatur (Übersicht bei TERPLAN und ZAADHOF (1974)) bekannt ist und bei eigenen Versuchen erneut bestätigt werden konnte - u.a. auch von Enterotoxinkonzentration und Art des Mediums abhängig und bei 80 - 85°C stärker als bei 100°C, betrug jedoch bei auf 100°C erhitztem Pufferextrakt aus Lebensmitteln mit hohem Enterotoxingehalt weit mehr als 50%. Aufgrund dieser Tatsache erhebt sich die Frage, ob eine Erhitzung des Lebensmittel-Pufferextraktes überhaupt sinnvoll ist, zumal keines der anderen Extraktionsverfahren (Übersicht 2) eine derartige Erhitzung vorsieht.

Zusammenfassend läßt sich aufgrund der eigenen Untersuchungen sagen, daß der Enterotoxinnachweis mit dem Froschspermatetest und dem ihm vorgeschalteten Extraktionsverfahren trotz des sehr geringen Zeitaufwandes von nur 8 - 10 Std. (STOJANOW und NESTOROW, 1967; MEESER und STOJANOW, 1968; MÜLLER, 1969 a und b; STOJANOW und SCHENK, 1970; SCHMIDT, WEIS und WEVER, 1972) für den Nachweis von Enterotoxin in Lebensmitteln aufgrund zu geringer Empfindlichkeit und ungenügender Spezifität offensichtlich nicht geeignet ist. Da jedoch einzelne Angaben zur Durchführung des Untersuchungsverfahrens sehr ungenau gehalten sind, ist nicht auszuschließen, daß bei genauer Kenntnis aller Einzelheiten - sofern solche überhaupt und irgendwo fixiert sein sollten - zumindest eine bessere Sensitivität erzielt worden wäre. Aufgrund der Daten von STOJANOW und NESTOROW (1967), MÜLLER (1969 b) sowie SCHMIDT, WEIS und WEVER (1972) ist es jedoch unwahrscheinlich, daß sich die Forderung nach einer Nachweisgrenze von 0,125 bis 0,25 mcg Enterotoxin pro 100 g Lebensmittel (REISER et al., 1974) erfüllen läßt. Als entscheidender Nachteil stellt sich jedoch die geringe Spezifität des FST heraus, die selbst bei einer Modifizierung des Untersuchungsverfahrens kaum verbessert werden kann.

5. Zusammenfassung

I. Die Prüfung des Froschspermatests (FST) nach KRÜGER, STOJANOW und MEESER (1965, 1968) auf seine Eignung zum spezifischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen ergab folgende Resultate:

1. Konzentrationen über 20 mcg Enterotoxin B (Makor)/ml unterschieden sich zwar hinsichtlich der Abnahme der Bewegungsaktivität der Froschspermien statistisch signifikant von denen der enterotoxinfreien Kontrolle, jedoch ließen sich Einzelwerte enterotoxinhaltiger Proben von enterotoxinfreien nicht immer voneinander abgrenzen. Diese Empfindlichkeit liegt wesentlich über der von den genannten Autoren mit weniger als 1 mcg angegebenen Grenze.
2. Verschiedene zur Auflösung lyophilisierten Enterotoxins eingesetzte Flüssigkeiten (autosteriles Lösungsmittel, physiologische Kochsalzlösung, Aqua dest., Hirn-Herz-Bouillon) sowie zur Extraktion von Enterotoxin aus Lebensmitteln verwendete Reagenzien (Chloroform, Trypsin, Esbach's Reagenz) waren im Gegensatz zum Dinatriumhydrogenphosphatpuffer ebenfalls spermizid. Auch Coli-Endotoxin sowie Staphylokokken-Hämolysine beeinflussten die Beweglichkeit von Froschspermien.

II. Die Prüfung der Eignung der dem FST vorgeschalteten "präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln" (STOJANOW und SCHENK, 1966, 1970) in Modellversuchen erbrachte, daß bei Erhitzen, Dialyse und Konzentration bzw. Gelfiltration erhebliche Enterotoxinmengen verlorengehen können.

Bei 31 Lebensmittelproben, denen definierte Mengen an Enterotoxin B (144,0 - 200,0 mcg/ml) zugesetzt worden waren, ergaben sich Wiedergewinnungsraten von 52 - 75% (serologischer Test) bzw. 56 - 75% (FST), bei niedrigen Enterotoxinkonzentrationen (10 - 2,5 mcg/ml) jedoch nur Wiedergewinnungsraten von 4 - 5%. Enterotoxinmengen von

weniger als 2,5 mcg/ml waren nach der Isolierung nicht mehr nachzuweisen. Auch hier differieren die eigenen Ergebnisse von denen oben genannter Autoren, die eine Wiedergewinnungsrate von bis zu 92% angeben. Auch der zur immunologischen Identifizierung angewandte Ring-präzipitationstest nach SIROTININA (1962) läßt an Spezifität zu wünschen übrig.

Summary

I. Investigations on the suitability of the frog spermatozoa test (FST) according to KRÜGER, STOJANOW and MEESER (1965, 1968) for the detection of staphylococcal enterotoxins gave the following results:

1. The average mobility of the spermatozoa treated with enterotoxin B (Makor) in concentrations of more than 20 mcg/ml was significantly lower than that of the enterotoxin-free controls whereas the individual results of samples without or with small amounts of enterotoxin did not always differ. The sensitivity proclaimed by the authors of less than 1 mcg/ml could not be reached in any case. Enterotoxin A was not as active as enterotoxin B.
2. In contrast to the 0,02 M di-sodium phosphate some liquids recommended for the solution of lyophilized enterotoxin (physiological saline, distilled water, Brain-Heart-Infusion-Broth, auto-sterile solvent) as well as reagents used for the extraction of enterotoxin from food (chloroform, trypsin, Esbach's reagent) decreased the mobility of the spermatozoa. α - and β -hemolysins of *Staphylococcus aureus* and endotoxins of *Escherichia coli* were spermatocidal, too.

II. In addition, the suitability of the "procedure for the isolation of staphylococcal enterotoxin from food" (STOJANOW and SCHENK, 1966, 1970) was tested. These experiments showed that considerable amounts of enterotoxin can be lost by heat-treatment, dialysis, concentration, and gel-filtration.

The recovery rate of high amounts of enterotoxin B (144,0 - 200,0 mcg/ml) added to different foods ranged from 52 to 75% (serological test) and 56 to 75% (FST) respectively whereas only 4 to 5% were recovered using low enterotoxin concentrations (from 10 to 2.5 mcg/ml). Enterotoxin concentrations of less than 2.5 mcg/ml food could not be detected after the isolation procedure. Here too, own results differ from the recovery rate of 92% published by the above mentioned authors. Also the immunological identification of enterotoxin by the "Ringpräzipitationstest" (SIROTININA, 1962) was not always specific.

6. Literatur

ANDERSON, K. (1953):

The effect of staphylococcal filtrates on isolated rabbit small intestine, with special reference to enterotoxigenic strains of *Staph. pyogenes*.
Brit. J. Exp. Path. 34, 548 - 555.

ANDERSON, K., D.M. JAMES und J. MARKS (1954):

The action of staphylococcal toxins on isolated rabbit intestine.
J. Hyg. 52, 492 - 501.

ANGELOTTI, R. (1962):

Unveröffentlichte Ergebnisse.
zit. nach CHANG, S.L. und H.H. HALL (1963).

DERSELBE (1969):

Staphylococcal intoxications.
in RIEMANN, H.: Food-borne infections and intoxications.
I. Aufl. Academic Press, New York and London, 359 - 393.

ARBUTHNOTT, J.P., J.H. FREER und A.C. McNIVEN (1973):

Physical properties of staphylococcal α -toxin and aspects of α -toxin membrane interactions.
Staphylococci and Staphylococcal Infections, 285 - 297.

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361.
Biochem. 6, 1474 - 1480.

BARBER, M.A. (1914):

Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow.
Philippine J. Sci., Sec. B 9, 669 - 684.

BARBER, L.E. und R.H. DEIBEL (1972):

Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage.
Appl. Microbiol. 24, 891 - 898.

BAYLISS, M. (1940):

Studies on the mechanism of vomiting produced by Staphylococcus enterotoxin.
J. Exptl. Med. 72, 669 - 684.

BEISEL, W.R. (1972):

Pathophysiology of staphylococcal enterotoxin, type B, (SEB) toxemia after
intravenous administration to monkeys.

Toxicon 10, 433 - 440.

BERGDOLL, M.S. (1969):

Bacterial toxins in food.

Food Technol. 23, 132 - 135.

DERSELBE (1970):

Enterotoxins.

in: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL: Microbial Toxins, Bd. 3, 265 - 326.
Academic Press, New York und London.

DERSELBE (1972):

The enterotoxins.

in: COHEN, J.O.: The staphylococci.

Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 301 - 331.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481 - 1485.

BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA und G.M. DACK (1961):

The recovery of staphylococcal enterotoxin from bacterial culture
supernatants by ion exchange.

J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3, 41 - 50.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):

Identification of enterotoxin E.

Infect. Immun. 4, 593 - 595.

BERGDOLL, M.S., J.L. KADAVY, M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1951):
Partial purification of staphylococcal enterotoxin.
Arch. Biochem. Biophys. 33, 259 - 262.

BERGDOLL, M.S., R.N. ROBBINS, K. WEISS, C.R. BORJA, I.Y. HUANG und
F.S. CHU (1973):
The staphylococcal enterotoxins: similarities.
Contributions to Microbiology and Immunology 1, 390 - 396.

BIO-RAD LABORATORIES (1971):
Gel Chromatography.
Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif. (USA).

DE BLASI, R. (1954):
Le tossinfezioni alimentari da stafilococco enterotossico. Osservazioni
sugli aspetti epidemiologici e batteriologici.
Ann. San. publ., Roma 15, 45 - 77.
zit. nach KIENITZ (1958 c).

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):
Purification and partial characterization of enterotoxin C, produced by
Staphylococcus aureus strain 137.
Biochem. 6, 1467 - 1473.

BORJA, C.R., E. FANNING, I.Y. HUANG und M.S. BERGDOLL (1972):
Purification and some physicochemical properties of staphylococcal
enterotoxin E.
J. Biol. Chem. 247, 2456 - 2463.

BORTHWICK, G.R. (1933):
Experimental observations on the toxic effects of staphylococcal filtrates
introduced enterally in laboratory animals.
Brit. J. exp. Path. 14, 236 - 240.

BRAYMEN, D.T. (1964):

Resistance of bacteria to purified staphylococcus enterotoxin B.
J. Bact. 87, 971.

BRUNSON, K.W. und D.W. WATSON (1974):

Pyrogenic specificity of streptococcal exotoxins, staphylococcal enterotoxin and gram-negative endotoxin.
Infection and Immunity, Vol. 10, 2, 347 - 351.

CASMAN, E.P. (1967):

Staphylococcal food poisoning.
Health Lab. Sci. 4, 199 - 206.

CASMAN, E.P. und R.W. BENNETT (1963):

Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A.
J. Bact. 86, 18 - 23.

DIESELBEN (1965):

Detection of staphylococcal enterotoxin in food.
Appl. Microbiol. 13, 181 - 189.

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):

Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.
J. Bact. 94, 1875 - 1882.

CECCARELLI, A. und F. DEL FRANCIA (1952):

Zooprof. 2, 337.
zit. nach KIENITZ (1958 c).

CHANG, S.L. und H.E. HALL (1963):

Resistance of free-living nematodes to staphylococcal enterotoxin.
Appl. Microbiol. 11, 365 - 367.

CHU, F.S., K. THADHANI, E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1966):

Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A.
Biochem. 5, 3281 - 3289.

CLARK, W.G. und H.L. BORISON (1963):

Pyrogenic effect of purified staphylococcal enterotoxin.
J. Pharmacol. 142, 237 - 241.

CRAIG, C.P., S.J. NORMANN, V. MCGANN und W.S. IRVIN (1971):
Chemotactic activity generated by staphylococcal enterotoxin B.
Infect. Immun. 3, 94 - 99.

CRAWLEY, G.J., J.N. BLACK, I. GRAY und J.W. BLANCHARD (1966):
Clinical chemistry of staphylococcal enterotoxin poisoning in monkeys.
Appl. Microbiol. 14, 445 - 450.

DACK, G.M. (1952):
Food poisoning.
University of Chicago Press, S. 80 - 118.

DACK, G.M., W.E. CARY, O. WOOLPERT und H. WIGGERS (1930):
An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic
staphylococcus.
J. Prevent. Med. 4, 167 - 175.

DANGERFIELD, H.G. (1973):
Effects of enterotoxins after ingestion by humans.
Vortrag American Society for Microbiology,
73rd Ann. Meet., Miami Beach (USA).

DAVISON, E. und G.M. DACK (1939):
Some chemical and physical studies of staphylococcus enterotoxin.
J. Infect. Dis. 64, 302 - 306.

DAVISON, E., G.M. DACK und W.E. CARY (1938):
Attempts to assay the enterotoxic substance produced by staphylococci
by parenteral injection of monkeys and kittens.
J. Infect. Dis. 62, 219 - 223.

DEL VALLE, M.R. (1960):
The nematode as an assay organism for staphylococcal enterotoxin.
M.S. Thesis, University of Wisconsin, Madison.
zit. nach CHANG, S.L. und H.E. HALL (1963).

DENNY, C.B. und C.W. BOHRER (1963):

Improved cat test for enterotoxin.

J. Bact. 86, 347 - 348.

DENNY, C.B., J.Y. HUMBER und C.W. BOHRER (1971):

Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer.

Appl. Microbiol. 21, 1064 - 1066.

DOLMAN, C.E. und R.J. WILSON (1938):

Experiments with staphylococcal enterotoxin.

J. Immunol. 35, 13 - 30.

DIESELBEN (1940):

The kitten test for staphylococcus enterotoxin.

Can. J. Publ. Health 31, 68 - 71.

DOLMAN, C.E., R.J. WILSON und W.H. COCKROFT (1936):

A new method of detecting staphylococcus enterotoxin.

Can. J. Publ. Health 27, 489 - 493.

zit. nach DACK, G.M. (1952).

DONNELLY, C.B., J.E. LESLIE und L.A. BLACK (1968):

Production of enterotoxin A in milk.

Appl. Microbiol. 16, 917 - 924.

DONNELLY, C.B., J.E. LESLIE, L.A. BLACK und K.H. LEWIS (1967):

Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese.

Appl. Microbiol. 15, 1382 - 1387.

EDDY, C.A. (1951):

The frog test for staphylococcal enterotoxin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 131 - 134.

FULTON, F. (1943):

Staphylococcal enterotoxin - with special reference to the kitten test.
Brit. J. exp. Path. 24, 65 - 72.
zit. nach MATHESON, B.H. und F.S. THATCHER (1955).

FUNG, D.Y.C., D.H. STEINBERG, R.D. MILLER, M.J. KURANTNICK und
T.F. MURPHY (1973):

Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C.
Appl. Microbiol. 26, 938 - 942.

GILBERT, Ch.F. (1966):

Effects of staphylococcal enterotoxin B on the coagulation mechanism
and leukocytic response in beagle dogs - a preliminary study.
Thromb. Diath. haemorrh. 16, 697 - 706.

GRIGOROVA, M. und S. DANON (1968):

The effect of staphylococcal enterotoxin on tissue cultures.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 206, 478 - 481.

GUERIN, M.M., A.W. JACKSON und J.F. MORGAN (1962):

Tissue culture and immunological studies with purified staphylococcal
toxins.
Can. J. Publ. Health 53, 38 - 39.

GWATKIN (1937):

Can. Publ. Health J. 28, 185.
zit. nach DOLMAN, C.E. und R.J. WILSON (1938).

HALL, H.E., R. ANGELOTTI und K.H. LEWIS (1963):

Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in food by
gel-diffusion methods.
Public Health Report 78, 1089 - 1098.

DIESELBEN (1965):

Detection of the staphylococcal enterotoxins in food.

Health Lab. Sci. 2, 179 - 191.

HALLANDER, H.O. und S. BENGTSSON (1967):

Studies on the cell toxicity and species specificity of purified staphylococcal toxins.

Acta path. et microbiol. scandinav. 70, 107 - 119.

HAMMON, W. McD. (1941):

Staphylococcus enterotoxin: An improved cat test, chemical and immunological studies.

Am. J. Publ. Health 31, 1191 - 1198.

HAYAMA, T. und H. SUGIYAMA (1964):

Diarrhea in cecetomized rabbits induced by staphylococcal enterotoxin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 115 - 118.

HODOVAL, L.F., E.L. MORRIS, D.D. ELSBERRY und W.R. BEISEL (1967):

Effect of staphylococcal enterotoxin B on the electroencephalogram of monkeys.

Appl. Microbiol. 15, 403 - 406.

HODOVAL, L.F., E.L. MORRIS, G.J. CRAWLEY und W.R. BEISEL (1968):

Pathogenesis of lethal shock after intravenous staphylococcal enterotoxin B in monkeys.

Appl. Microbiol. 16, 187 - 192.

HÖHNE, C. (1967):

Versuche zum Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins im Agargel-präzipitationstest.

Z. Immunforsch. 132, 12 - 25.

HOLBROOK, R. und A.C. BAIRD-PARKER (1975):

Serological methods for the assay of staphylococcal enterotoxins.

Society for applied bacteriology, techn. series 8, 108 - 128.

Academic Press, London, New York und San Francisco.

HOLTMAN, D.F. und W.A. PETERSON (1952):
Evidence of a staphylococcal neurotoxin.
J. Bact. 64, 890 - 891.

HOPKINS, E.W. und E.F. POLAND (1942):
Young pigs as test animals for staphylococcus enterotoxin.
Food Res. 7, 414 - 419.

HUSSEMAN, D.L. und F.W. TANNER (1949):
A comparison of strains of staphylococci isolated from foods.
Food Res. 14, 91 - 97.
zit. nach MATHESON, B.H. und F.S. THATCHER (1955).

INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1970):
Standard method for determining the colony count of dried milk and
whey powder.
Internationaler Standard FIL-IDF 49.

JAMLANG, E.M., M.L. BARTLETT und H.E. SNYDER (1971):
Effect of pH, protein concentration, and ionic strength on heat
inactivation of staphylococcal enterotoxin B.
Appl. Microbiol. 22, 1034 - 1040.

JONES, A.H. und A.G. LOCHHEAD (1939):
A study of micrococci surviving in frozen-pack vegetables and their
enterotoxic properties.
Food Res. 4, 203 - 216.
zit. nach MATHESON, B.H. und F.S. THATCHER (1955).

JORDAN, E.O. (1930):
The production by staphylococci of a substance causing food poisoning.
J.A.M.A. 94, 1648 - 1650.

JORDAN, E.O. und W. BURROWS (1933):

Nature of substance causing staphylococcus food poisoning.

Proc. Soc. Exptl. Med. 30, 448 - 449.

DIESELBEN (1935):

The production of enterotoxic substance by bacteria.

J. Infect. Dis. 57, 121 - 128.

JORDAN, E.O. und J. McBROOM (1931):

Results of feeding staphylococcus filtrates to monkeys.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 29, 161 - 162.

JORGENSEN, J.H., H.F. CARVAJAL, B.E. CHIPPS und R.F. SMITH (1973):

Rapid detection of gram-negative bacteriuria by use of the Limulus-endotoxin-assay.

Appl. Microbiol. 26, 38 - 42.

KELSEY, J.C. und B.C. HOBBS (1954):

Studies on the effect of staphylococcal culture filtrates on isolated rabbit gut.

J. Hyg. 52, 502 - 509.

KIENITZ, M. (1958 a):

Zum Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins an der weißen Maus.

Zbl. Bakt. I Orig. 171, 451 - 456.

DERSELBE (1958 b):

Über die Wirkung des Staphylokokken-Enterotoxins auf Hühnerembryonen.

Klin. Wochenschrift 36, 239 - 240.

DERSELBE (1958 c):

Über den Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins. 1. Die bekannten biologischen Verfahren.

Zbl. Bakt. I Ref. 168, 117 - 132.

DERSELBE (1962):

Neuere Untersuchungen über Darstellung und Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin.

Zbl. Bakt. I Orig. 184, 87 - 91.

KIENITZ, M. und R. PREUNER (1958):

Über den Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins. 2. Untersuchungen zur Wirkung enterotoxinbildender Staphylokokken auf Hühnerembryonen.

Zbl. Bakt. I Orig. 173, 203 - 212.

DIESELBEN (1959):

Über den Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins. 3. Untersuchungen über die Wirkung des Staphylokokken-Enterotoxins auf Hühnerembryonen.

Zbl. Bakt. I Orig. 174, 56 - 70.

KIENITZ, M. und G. SCHMELTER (1964):

Untersuchungen über den Einfluß von Staphylokokkentoxinen auf Affen-nieren-Zellkulturen.

Zbl. Bakt. I Orig. 193, 447 - 453.

KIENITZ, M., W. RITZERFELD, W. HÜTHER und J. RATH (1961):

Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegen-über bakteriellen Infektionen. IV. Der Einfluß von Staphylokokkentoxinen auf die mit Fremdeiweiß vorbehandelte weiße Ratte.

Zschr. Hyg. 148, 159 - 167.

KRÜGER, W., I.M. STQJANOW und G. MEESER (1965):

Verfahren zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin.

DDR Patentschrift Nr. 44088 vom 23.12.1965.

DIESELBEN (1968):

Process for detecting Staphylococci-enterotoxin in foodstuffs.

U.S. Patent Office Nr. 3408259 vom 29.8.1968.

KUHNT, J.V. (1974):

Zum Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken und Enterotoxinen in sauren Milchprodukten.
Vet. med. Diss., München.

KUPCHIK, G.J. (1937):

Some cultural and biochemical characteristics of enterotoxic staphylococci.
J. Infect. Dis. 61, 320 - 324.

LEGLER, F., F. BURKHARDT und W. WENDRICH (1957):

Staphylococcus aureus im Camembert-Käse als Ursache von Lebensmittelvergiftungen.
Öff. Gesundheitsdienst 19, 198 - 203.

LÜDERITZ, O., O. WESTPHAL, A.M. STAUB und H. NIKAIIDO (1971):

Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides.
in: Microbial Toxins IV, 145 - 224.

MANCINI, G., A.O. CARBONARA und J.F. HEREMANS (1965):

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2, 235 - 254.

MATHESON, B.H. und F.S. THATCHER (1955):

Studies with staphylococcal toxins. I. A reappraisal of the validity of the "kitten test" as an indication of staphylococcal enterotoxin.
Can. J. Microbiol. 1, 372 - 381.

MARTIN, W.J. und S. MARCUS (1964):

Relation of pyrogenic and emetic properties of enterobacteriaceal endotoxin and of staphylococcal enterotoxin.
J. Bact. 87, 1019 - 1026.

McGANN, V.G., J.B. ROLLINS und D.W. MASON (1971):

Evaluation of resistance to staphylococcal enterotoxin B: Naturally acquired antibodies of man and monkey.
J. Infect. Dis. 124, 206 - 213.

McINTOSH, M. und D.E. DUGGAN (1965):

Staphylococcal enterotoxin: Effect on protozoa.

J. Protozool. 12, 342 - 344.

McINTOSH, M. und D.D. WATT (1971):

In vitro anaphylactic response to staphylococcal enterotoxin.

Toxicon 9, 163 - 168.

MEESER, G. und I. STOJANOW (1968):

Erarbeitung eines empfindlichen und spezifisch-biologischen Testes
zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin.

FBM-Milchstandard 10, 176 - 178.

MERCIER, P., J. PILLET, P. CHABANIER und B. ORTA (1951):

Caractères biologiques des staphylocoques isolés d'intoxications
alimentaires et méthodes de détection de l'entérotoxine staphylococcique.

Ann. Inst. Pasteur 80, 563 - 565.

MEYER, R. (1949/50):

Über eine Wurstvergiftung durch Staphylococcus aureus haemolyticus.

Z. Hyg. 130, 173 - 176.

DERSELBE (1951):

Über eine weitere Wurstvergiftung durch Staphylococcus aureus
haemolyticus.

Z. Hyg. 132, 29 - 33.

MEYER, J. (1973):

Zum Vorkommen von Staphylokokken-Enterotoxinen in Trockenmilchprodukten.

Vet. med. Diss., Hannover.

MILONE, N.A. (1962):

Studies on the use of tissue culture for the bioassay of staphylococcal
enterotoxin.

J. Food Sci. 27, 501 - 507.

MINARD, E.L. (1939):

Some experiments with staphylococcus enterotoxin production.

J. Bact. 38, 351 - 352.

MINETT, F.C. (1938):

Experiments on Staphylococcus food poisoning.

J. Hyg. 38, 623 - 637.

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1971/72):

Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications. A review.

J. Milk Fd. Technol. 34, 557 - 564; 35, 21 - 29; 77 - 82 und 228 - 241.

MÖLLBY, R. und T. WADSTRÖM (1973):

Purification of staphylococcal beta-, gamma- and delta-hemolysins.

Staphylococci and Staphylococcal Infections, 298 - 313.

MOSEER, L. (1953):

Über bakterielle Lebensmittelvergiftungen.

Dtsch. med. Wschr. 78, 1762 - 1765.

MÜLLER, F.J. (1969 a):

Die Staphylokokkenenterotoxine.

Alimenta 8, 93 - 95.

DERSELBE (1969 b):

Die Staphylokokkenenterotoxine.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 90, 2111 - 2114.

MÜLLER, F.J. und I. STOJANOW (1971):

Die Epidemiologie der Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung.

Alimenta 10, 22 - 27.

NIKODEMUSZ, I., L. KANIZSAI und E. SELLEI (1963):

A new method for the demonstration of enterotoxin production by staphylococci.

Acta Medica Hungarica 19, 209 - 215.

NORMAN, S.J., R.F. JAEGER und R.T. JOHNSEY (1969):

Pathology of experimental enterotoxemia. The in vivo localization of staphylococcal enterotoxin.

B. Lab. Invest. 20, 17 - 25.

NORTH, W.R. (1943):

Staphylococcus enterotoxin in relation to alpha-hemolysin production in simple media.

Food Res. 8, 169 - 178.

zit. nach MATHESON, B.H. und F.S. THATCHER (1955).

OBIGER, G. (1960):

Zur Frage der milchhygienischen Bedeutung der Staphylokokken.

Arch. Lebensmittelhyg. 11, 265 - 271.

DERSELBE (1961):

Zum Pathogenitätsbegriff und -nachweis von Staphylokokken aus Milch.

Tierheilk. 13, 225 - 239.

OEDING, P. (1953):

zit. nach STOJANOW, I. und N. NESTOROW (1967).

ODIN, J. (1952):

III. Techniques and analysis of the quantitative precipitin reaction.

B. Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis.

Methods Med. Res. 5, 335 - 378.

PETROFF, Ch. (1962):

Über die Lebensdauer der Spermatozoiden unter dem Einfluß von Bakterien und monochromatischem Licht.

Naturwiss. 49, 117 - 118.

PEAVY, D.L., W.H. ADLER und R.T. SMITH (1970):

The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes.

J. Immunol. 105, 1453 - 1458.

PHARMACIA FINE CHEMICALS (1967):

Sephadex^(R) - Gelfiltration in Theorie und Praxis.

Uppsala, Schweden.

PIKKARAINEN, J. (1938/39):

Über Nahrungsmittelvergiftungen, verursacht durch Staphylococcus aureus.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 143, 60 - 66.

PISU, I. (1951):

La prova biologica nella rana per la identificazione della enterotossina stafilococcica.

Boll. Ist. sieroterap. milan 30, 622 - 637.

PÖHN, H.-P. und M. KIENITZ (1960):

Über den Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins. 4. Untersuchungen an Staphylokokken-Stämmen von eitrigen Erkrankungen und gesunden Keimträgern.

Zbl. Bakt. I Orig. 177, 555 - 559.

PROHASKA, J.V., M.J. JACOBSON, C.T. DRAKE und T.-L. TAN (1959):

Staphylococcus enterotoxin enteritis.

Surg. Gynecol. Obstet. 109, 73 - 77.

RAJ, H.D. und M.S. BERGDOLL (1969):

Effect of enterotoxin B on human volunteers.

J. Bact. 98, 833 - 834.

RAJ, H. und J. LISTON (1962):

Bacteriol. Proc. P 65

zit. nach RAJ, H. und M.S. BERGDOLL (1969).

RAKAROWA, N., S. STEFFANOWA und I. STANKOWA (1971):

Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin A in Gewebekulturen.

Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. A 218, 45 - 48.

RAMSEY, R.J. und P.H. TRACY (1931):

Food poisoning probably caused by orange colored Staphylococcus from udders of apparently healthy cows.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 28, 390 - 391.

RAPOPORT, M.I., L.F. HODOVAL, E.W. GROGAN, V. MCGANN und W.R. BEISEL (1966):

The influence of specific antibody to disappearance of staphylococcal enterotoxin B from blood.

J. Clin. Invest. 45, 1365 - 1372.

READ, R.B. und J.G. BRADSHAW (1966 a):

Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in Veronal buffer.

Appl. Microbiol. 14, 130 - 132.

DIESELBEN (1966 b):

Staphylococcal enterotoxin B thermal inactivation in milk.

J. Dairy Sci. 49, 202 - 203.

READ, R.B., W.L. PRITCHARD, J.G. BRADSHAW und L.A. BLACK (1965 a):

In vitro assay of staphylococcal enterotoxins A and B from milk.

J. Dairy Sci. 48, 411 - 419.

DIESELBEN (1965 b):

Assay of staphylococcal enterotoxin from cheese.

J. Dairy Sci. 48, 420 - 424.

REISER, R., D. CONAWAY und M.S. BERGDOLL (1974):

Detection of staphylococcal enterotoxin in foods.

Appl. Microbiol. 27, 83 - 85.

RICHMOND, J. (1939):

The effect of the Staphylococcus enterotoxin in the motility of the isolated smooth muscle of the rabbit gut.

U.S. Thesis, University of Illinois.

zit. nach RICHMOND, J.J. et al. (1942).

RICHMOND, J.J., C.I. REED, H.J. SHAUGHNESSY und V. MICHAEL (1942):

The effect of staphylococcus enterotoxin on isolated rabbit gut segments.

J. Bact. 44, 201 - 205.

RICHTER, B. (1974):

Zur Produktion von Staphylokokkenenterotoxin B in verschiedenen flüssigen Nährmedien.

Vet. med. Diss., München.

RIGDON, R.H. (1938):

Observations on Dolman's test for determining the presence of staphylococcal enterotoxin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38, 82 - 84.

ROBINTON, E.D. (1949):

The effect of staphylococcal enterotoxin upon the frog (Rana pipiens).

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 265 - 266.

DIESELBE (1950):

A rapid method for demonstrating the action of staphylococcus enterotoxin upon Rana pipiens.

Yale J. Biol. Med. 23, 94 - 98.

zit. nach SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1953).

ROLLE, M. und J. KALICH (1954):

Zur Diagnose der toxischen Kolikeime durch Agglutination der Spermazellen.

Münch. med. Wschr. 96, 579 - 580.

SATTERLEE, L.D. und A.A. KRAFT (1969):

Effect of meat and isolated meat proteins on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Microbiol. 17, 906 - 909.

SCHAEFFER, W.I. (1970):

Interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures.

Infect. Immun. 1, 455 - 458.

SCHAEFFER, W.I., J. GABLIKS und R. CALITIS (1966):

Interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures of human embryonic intestine.

J. Bact. 91, 21 - 26.

DIESELBEN (1967):

Interference by trypsin in the interaction of staphylococcal enterotoxin B and cell cultures of human embryonic intestine.

J. Bact. 93, 1489 - 1492.

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO, D.A. DUNNERY und M.S. BERGDOLL (1965):

Purification of staphylococcal enterotoxin B.

Biochem. 4, 1011 - 1016.

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, M.J. WOODBURN, J.M. LYNCH, H.M. JACOBY, S.J. SILVERMAN, J.C. GORMAN und L. SPERO (1972):

Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A.

Biochem. 11, 360 - 366.

SCHMIDT, H., W. WEIS und H. WEVER (1972):

Untersuchungen über den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Milch und anderen Lebensmitteln.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 141 - 146.

SCHURR, S. (1970):

Untersuchungen zum Enterotoxinbildungsvermögen und zur Hitzeresistenz von aus Milch isolierten Staphylokokken.

Vet. med. Diss., Hannover.

SEDLAK, J. (1957):

Enterotoxikosis staphylococcia.

Zbl. Bakt. I Orig. 170, 129 - 135.

SEDLAK, J. und J. PRUCHOVA (1958):

Zur Laboratoriumsdiagnostik von Enterotoxikosis staphylococcia.

Z. Immun.Forsch. 116, 109 - 125.

SEELEMAN, M. und G. OBIGER (1956):

CAMP-Test und TKT-Medium, ihre Bedeutung für Galt-diagnose und Galt-bekämpfung.

Milchwiss. 4, 98 - 103 und 134 - 140.

SEEMAN, J. und B. CURIK (1955):

Versuche zum Nachweis des Staphylococcus-Enterotoxins mit einem Frosch-Test (*Rana esculenta*).

Csl. Hemi IV/4, 211.

ref. Zbl. Bakt. I Ref. 158 (1955), 424.

SHAUGHNESSY, H. und T.C. GRUBB (1936):

Staphylococcus food poisoning.

J. Infect. Dis. 58, 318 - 323.

SINGER, A. und W.A. HAGAN (1941):

Staphylococcal toxins.

J. Bact. 41, 74 - 75.

SIROTININA, O.N. (1962):

Staphylococcus enterotoxin and methods of its determination in food.

J. Mikrobiol. Epid. Immunol. 33, 90 - 94.

SLANETZ, L.W. (1942):

Studies on staphylococcal toxins.

J. Bact. 43, 105 - 106.

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137.

STOJANOW, I. (1964):

Das Staphylokokken-Enterotoxin, seine milchhygienische Bedeutung und sein Nachweis.

Referate der 3. Intern. Milchwirtsch. Fachtagung der DDR, Berlin.

STOJANOW, I. und G. MEESER (1970):

Staphylokokken-Nahrungsmittel-Enterotoxikosen.

Alimenta 9, 228 - 230.

STOJANOW, I. und N. NESTOROW (1967):

Schnellmethode zur Bestimmung von Staphylokokken-Enterotoxin in Fleisch-erzeugnissen.

XIII. Kongreß der Europ. Fleischforscher in Rotterdam, Niederlande.

STOJANOW, I. und E. SCHENK (1966):

Verfahren zur präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln.

DDR-Wirtschaftspatent Nr. 50358 vom 20.9.1966.

DIESELBEN (1970):

Process for the isolation of staphylococci-enterotoxin from foodstuffs.

United States Patent Office Nr. 3525731 vom 25.8.1970.

STOJANOW, I., M. ANWAND und G. MEESER (1967):

Beitrag zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin. II. Über die Wirkung des Staphylokokkenenterotoxins auf Nematoden.

Arch. exper. Veterinärmed. 21, 609 - 613.

STOJANOW, I., G. MEESEER und M. ANWAND (1967):

Beitrag zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin. 1. Mitt.: Über die Wirkung von Staphylokokkenenterotoxin auf Wasserflöhe (Daphnien).

Die Nahrung 11, 325 - 330.

SUGIYAMA, H. (1960):

zit. nach STOJANOW, I., M. Anwand und G. MEESEER (1967).

DERSELBE (1966):

Endotoxin-like responses induced by staphylococcal enterotoxin.

J. Infect. Dis. 116, 162 - 170.

SUGIYAMA, H., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1962):

Early development of a temporary resistance to the emetic action of staphylococcal enterotoxin.

J. Infect. Dis. 111, 233 - 238.

SUGIYAMA, H., E.M. McKISSIC und T. HAYAMA (1964):

Hyperfibrinogenemia and thrombocytopenia after staphylococcal enterotoxin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 726 - 729.

SUGIYAMA, H., E.M. McKISSIC, M.S. BERGDOLL und B. HELLER (1964):

Enhancement of bacterial endotoxin lethality by staphylococcal enterotoxin.

J. Infect. Dis. 114, 111 - 118.

SURGALLA, M.G. (1947):

A study of the production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined mediums.

J. Infect. Dis. 81, 97 - 111.

SURGALLA, M.J. und K.E. HITE (1945):

A study of enterotoxin and alpha and beta hemolysin production by certain staphylococcus cultures.

J. Infect. Dis. 76, 78 - 82.

SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1953):

Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test.

J. Lab. Clin. Med. 41, 782 - 788.

TANNER, F.W. und R.J. RAMSEY (1932):

Food poisoning due to a yellow micrococcus from milk.

Am. J. Med. Sci. 184, 80 - 85.

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1974):

Detoxifizierung von Toxinen mikrobiellen Ursprungs.

FBWM 74/4 Gutachten.

TERPLAN, G., P. SOMMERFELD und K.-J. ZAADHOF (1972):

Untersuchungen zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen (unveröffentlicht).

THATCHER, F.S. und B.H. MATHESON (1955):

Studies with staphylococcal toxins. II. The specificity of enterotoxin.

Can. J. Microbiol. 1, 382 - 400.

THATCHER, F.S. und J. ROBINSON (1962):

Food poisoning: An analysis of staphylococcal toxins.

J. Appl. Bact. 25, 378 - 388.

ULLNER, W. (1957):

Untersuchungen über die bakterizide Wirkung der Antibiotika-Schere bei Spermaverdünnern.

Zuchthygiene 1, 36 - 46.

URBACH, H. (1950):

Staphylokokken als Ursache einer Nahrungsmittelvergiftung.

Das deutsche Gesundheitswesen 5, 1327 - 1330.

URBACH, H., H. OEHRING und H. BRUNNEMANN (1968):

Versuche zum Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins mit Hilfe von Zellkulturen.

Arch. Hyg. 152, 504 - 508.

URBASCHKE, B., R. VERSTEYL und D. GÖTTE (1966):

Die Histamin-sensibilisierende Wirkung von Endotoxin aus gramnegativen Keimen.

Naturwiss. 53, 278 - 279.

DE WAART, J., F. VAN AKEN und H. POUW (1972):

Detection of orally toxic microbial metabolites in foods with bioassay systems.

Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. 222, 96 - 114.

WADSWORTH, C. (1957):

A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel.

Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol. 10, 355 - 360.

WARREN, S.E., M. JACOBSON, J. MIRANY und J. VAN PROHASKA (1964):

Acute and chronic enterotoxin enteritis.

J. Exptl. Med. 120, 561 - 568.

WILSON, B.J. (1959):

Comparative susceptibility of chimpanzees and Macaca mulatta monkeys to oral administration of partially purified staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 78, 240 - 242.

WOODWARD, J.M. und L.W. SLANETZ (1941):

Studies on staphylococcal toxins.

J. Bact. 42, 817 - 818.

WOOLPERT, O.C. und G.M. DACK (1933):

Relation of gastro-intestinal poison to other toxic substances produced by staphylococci.

J. Infect. Dis. 52, 6 - 19.

WORSECK, M. (1956):

Staphylokokken als Ursache von Lebensmittelvergiftungen und eigene Untersuchungen über die Toxidität von Mastitis-Staphylokokken.

Arch. Lebensmittelhyg. 7, 145 - 148.

ZEHREN, V.L. und V.F. ZEHREN (1968):

Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A.

J. Dairy Sci. 51, 635 - 644.

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seinen wissenschaftlichen Rat bei der Ausführung meiner Arbeit danken.

Insbesondere gilt auch mein Dank Herrn akad. Oberrat Dr. K.-J. Zaadhof für das besondere Interesse und die stets gewährte Hilfe bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Auch den Mitarbeitern des Instituts spreche ich an dieser Stelle für ihre freundliche Unterstützung meinen besonderen Dank aus.

Lebenslauf

Am 28. Februar 1949 wurde ich, Klaus Gantze, als Sohn des Tierarztes und Diplomlandwirtes Dr. Dr. Peter Gantze und seiner Frau Diplomlandwirtin Hildegard Gantze, geb. Reichelt, in Magdeburg geboren.

Die ersten drei Klassen der Volksschule absolvierte ich in Magdeburg, ein weiteres Jahr in Bargteheide/Holstein, danach besuchte ich die "Stormarnschule" in Ahrensburg, an der ich im Juni 1967 das Abitur bestand.

Das Studium der Tiermedizin nahm ich im Wintersemester 1967/68 an der Tierärztlichen Hochschule Hannover auf, unterbrach es zur Ableistung meines Wehrdienstes 1968 für 1 1/2 Jahre, und setzte es vom Sommersemester 1970 bis zum Bestehen des Physikums 1971 an der Tierärztlichen Hochschule Hannover weiter fort. Im Sommersemester 1971 immatrikulierte ich mich dann an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich im März 1974 das Staatsexamen beendete und im Juni 1974 die Bestallung als Tierarzt erhielt. Im Sommersemester 1973 wurde ich zum Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zugelassen, das ich bis zum Bestehen des Physikums 1975 neben meiner Tätigkeit als Doktorand am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch als Doppelstudium, danach ab Sommersemester 1975 an der MHL in Lübeck als Zweitstudium im 2. klinischen Semester betreibe.

